



PCT

特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(51) 国際特許分類6 C12N 15/57, C07K 14/47, 16/40, C12N 5/06, 9/64, C12P 21/02		A1	(11) 国際公開番号 WO99/05290
			(43) 国際公開日 1999年2月4日 (04.02.99)
(21) 国際出願番号 PCT/JP98/03324		(74) 代理人 弁理士 石田 敬, 外 (ISHIDA, Takashi et al.) 〒105-8423 東京都港区虎ノ門三丁目5番1号 虎ノ門37森ビル 青和特許法律事務所 Tokyo, (JP)	
(22) 国際出願日 1998年7月24日 (24.07.98) <i>24/07/98</i>		(81) 指定国 US, 欧州特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).	
(30) 優先権データ 特願平9/213969 1997年7月24日 (24.07.97) ✓ JP <i>24/07/97</i>		(添付) 公開書類 国際調査報告書	
(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) サントリー株式会社 (SUNTORY LIMITED) [JP/JP] 〒530-8203 大阪府大阪市北区堂島浜2丁目1番40号 Osaka, (JP)		(72) 発明者; および (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ) 鶴岡伸夫 (TSURUOKA, Nobuo) [JP/JP] ✓ 〒567-0827 大阪府茨木市稻葉町18-7-501 Osaka, (JP) 山城恭子 (YAMASHIRO, Kyoko) [JP/JP] ✓ 〒569-0852 大阪府高槻市北柳川町15-13-211 Osaka, (JP) 山口 希 (YAMAGUCHI, Nozomi) [JP/JP] ✓ 〒603-8146 京都府京都市北区鞍馬口通り寺町西入ル 新御靈口町285-79 Kyoto, (JP)	

(54) Title: NOVEL SERINE PROTEASE

(54) 発明の名称 新規セリンプロテアーゼ

(57) Abstract

A serine protease or peptide fragments thereof having an amino acid sequence identical with that of serine protease as shown in SEQ ID NO: 6 or amino acid sequences derived therefrom by deletion or substitution of a part of the same or addition of one or more amino acids thereto.

(57)要約

配列番号 6 に示すセリンプロテアーゼと同一のアミノ酸配列またはその一部が欠失もしくは置換したアミノ酸配列、あるいは該同一のアミノ酸配列またはその一部が欠失もしくは置換したアミノ酸配列に 1 乃至複数個のアミノ酸が付加されたアミノ酸配列を含んでなるセリンプロテアーゼまたはその部分ペプチド。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

AL アルバニア	FI フィンランド	LK スリ・ランカ	SI スロヴェニア
AM アルメニア	FR フランス	LR リベリア	SK スロヴァキア
AT オーストリア	GA ガボン	LS レソト	SL シエラ・レオネ
AU オーストラリア	GB 英国	LT リトアニア	SN ゼネガル
AZ アゼルバイジャン	GD グレナダ	LU ルクセンブルグ	SZ スウェーデン
BA ボスニア・ヘルツェゴビナ	GE グルジア	LV ラトヴィア	TD チャード
BB バルバドス	GH ガーナ	MC モナコ	TG トーゴー
BE ベルギー	GM ガンビア	MD モルドヴァ	TJ タジキスタン
BF ブルキナ・ファソ	GN ギニア	MG マダガスカル	TM トルクメニスタン
BG ブルガリア	GW ギニア・ビサオ	MK マケドニア旧ユーゴスラヴィア	TR トルコ
BJ ベナン	GR ギリシャ	共和国	TT トリニダッド・トバゴ
BR ブラジル	HR クロアチア	ML マリ	UA ウクライナ
BY ベラルーシ	HU ハンガリー	MN モンゴル	UG ウガンダ
CA カナダ	ID インドネシア	MR モーリタニア	US 米国
CF 中央アフリカ	IE アイルランド	MW マラウイ	UZ ウズベキスタン
CG コンゴ	IL イスラエル	MX メキシコ	VN ヴィエトナム
CH スイス	IN インド	NE ニジエール	YU ユーロースラビア
CI コートジボアール	IS アイスランド	NL オランダ	ZW ジンバブエ
CM カメルーン	IT イタリア	NO ノールウェー	
CN 中国	JP 日本	NZ ニュージーランド	
CU キューバ	KE ケニア	PL ポーランド	
CY キプロス	KG キルギスタン	PT ポルトガル	
CZ チェコ	KP 北朝鮮	RO ルーマニア	
DE ドイツ	KR 韓国	RU ロシア	
DK デンマーク	KZ カザフスタン	SD スーダン	
EE エストニア	LC セントルシア	SE スウェーデン	
ES スペイン	LI リヒテンシュタイン	SG シンガポール	

## 新規セリンプロテアーゼ

## 技術分野

本発明は、新規セリンプロテアーゼ、それをコードするDNA、及び該セリンプロテアーゼの製造方法、並びに該セリンプロテアーゼまたはそれをコードするDNAを用いる生理活性物質のスクリーニング方法に関する。

## 背景技術

セリンプロテアーゼは、動物、植物、微生物に広く存在し、特に、高等動物では、食物の消化、血液凝固・線溶、補体活性化、ホルモン産生、排卵・受精、食作用、細胞増殖、発生・分化、老化、癌転移など極めて多くの生体反応に関与していることがわかっている (Neurath, H. Science, 224, 350-357, 1984)。

近年、中枢神経系においてもセリンプロテアーゼが生理的に重要な機能分子として働いていることが確認されるようになった。例えば、脳内において発現しているセリンプロテアーゼとしては、組織型プラスミノーゲンアクチベーター (Sappiro, A-D., Madani, R., Huarte, J., Belin, D., Kiss, J. Z., Wohlwend, A., and Vassalli, J-D., J. Clin. Invest., 92, 679-685, 1993)、トロンビン (Monard, D. Trends Neurosci., 11, 541-544, 1988)、ヒトトリプシンIV (Wiegand, U., Corbach, S., Minn, A., Kang, J. and Müller-Hill, B., Gene, 136, 167-175, 1993)、ニューロプシン (Chen, Z-L., Yoshida, S., Kato, K., Momota, Y., Suzuki, J., Tanaka, T., Ito, J., Nishino, H., Aimoto, S., Kiyama, H., and

Shiosaka, S., J. Neurosci., 15(7), 5088-5097, 1995)、ニューロシン (Yamashiro, K., Tsuruoka, N., Kodama, S., Tsujimoto, M., Yamamura, Y., Tanaka, T., Nakazato, H., and Yamaguchi, N., Biochim. Biophys. Acta, 1350, 11-14, 1997) などが知られている。

これら脳内におけるセリンプロテアーゼは、ニューロンの神経突起の伸展に関与するばかりでなく、標的ニューロンとのシナプス形成過程に関与していることが想定されている (Liu, Y., Fields, R. D., Fitzgerald, S., Festoff, B. W., and Nelson, P. G., J. Neurobiol., 25, 3 25, 1994)。

しかしながら、これらセリンプロテアーゼの脳内における生理機能についてはほとんど解明されていない。また、脳内に発現し重要な生理機能を担うセリンプロテアーゼがその他多数存在することが予想されるがその多くは特定されていないのが現状である。

一方、凝固線溶補体系のある種のセリンプロテアーゼタンパク質は、クリングルドメイン、EGF-like構造、フィンガー構造、 $\gamma$ -carboxyglutamic acidドメインならびにアップルドメインなどの構造をN末端側に有している (Furie, B., and Furie, B. C., Cell, 53, 505-518, 1988)。例えば、クリングルドメインを持つセリンプロテアーゼタンパク質としてはウロキナーゼ、プラスミノーゲンアクチベーター、プラスミノーゲンなどが知られている。

クリングルドメインは、フィブリン、ヘパリンおよびリシンアナロゲとの結合能を有し (Scanu, A. M. and Edelstein, C., Biochimica. Biophysica. Acta, 1256, 1-12, 1995)、血液線溶系においては、析出したフィブリンにプラスミノーゲンアクチベーターがクリングルドメインを介して結合し、近傍に結合したプラスミンを活性化することが示されている。さらに、血管新生抑制因子アンジオスタチンが

、プラスミノーゲン分子中のクリングルドメインであることが明らかとなり (Cao, Y., Ji, R. W., Davidson, D., Scaller, J., Marti, D., Söhnadel, S., McCance, S. G., O'Reilly, M. S., Llinás, M., and Folkman, J., *J. Biol. Chem.*, 271, 29461-29467, 1996) 、クリングルドメイン構造単独の生理活性が初めて示された。

また、マクロファージスカベンジャー受容体において認められたスカベンジャー受容体システムリッチ (S R C R) ドメイン構造を有する一連のタンパク質群として、サイクロフィリン C 結合蛋白質、スペラクト (S p e r a c t) 受容体、コンプリメントファクター I、CD 5、CD 6 などの存在が知られている (Resnick, D., Pearson, A., and Krieger, M., *Trends. Biochem. Sci.*, 19, 5-8, 1994)。

サイクロフィリン C 結合蛋白質やコンプリメントファクター I は分泌タンパク質であるのに対して、スペラクト (S p e r a c t) 受容体や CD 5 および CD 6 は、膜結合型タンパク質であることが知られている。このうち、膜結合型タンパク質 CD 6 と結合するタンパク質が活性化白血球接着分子 (A L C A M) であることが見い出され、CD 6 の S R C R ドメイン構造に結合位置があることがわかった (Whitney, G. S., Starling, G. C., Bowen, M. A., Modrell, B., Siadak, A. W., and Aruffo, A. J. *Biol. Chem.*, 270, 18187-18190, 1995)。

さらに、CD 6 のリガンドである A L C A M は、活性化リンパ球やニューロンに発現していることが知られており、CD 6 は、A L C A M との相互作用を介して免疫系や神経系における恒常性の維持に一定の制御機能を果たしていることが推察される。

このように、複数のドメイン構造を有するタンパク質は、各ドメインが固有の機能を有するばかりでなく、各ドメインの機能が連関

して特異的な認識機能を持って機能しているものと考えられている。

### 発明の開示

本発明は上記の実情に鑑みてなされたものであり、その目的は新規なセリンプロテアーゼ、及びそれをコードする新規セリンプロテアーゼDNAを提供することにある。さらに、本発明は当該DNAを用いて当該プロテアーゼを大量に生産する方法及び該セリンプロテアーゼまたはそれをコードするDNAを用いる生理活性物質のスクリーニング方法を提供することを目的とするものである。

本発明者らは、鋭意研究を重ねた結果、脳内に発現するセリンプロテアーゼをコードするcDNAに良く保存されている領域をプローブとして用い、5'翻訳領域が特徴的なcDNAをスクリーニングすることにより、新規機能タンパク質をコードするcDNAを単離し、本発明を完成させるに至った。

従って本発明は、(1) 図7～12(配列番号: 6)に示すセリンプロテアーゼと同一のアミノ酸配列またはその一部が欠失もしくは置換したアミノ酸配列、あるいは該同一のアミノ酸配列またはその一部が欠失もしくは置換したアミノ酸配列に1乃至複数個のアミノ酸が付加されたアミノ酸配列を含んでなるセリンプロテアーゼまたはその部分ペプチドを提供する。

本発明はさらに、(2) 図7～12(配列番号: 6)に示すアミノ酸番号578から822までのアミノ酸配列からなるセリンプロテアーゼドメインと同一のアミノ酸配列またはその一部が欠失もしくは置換したアミノ酸配列、あるいは該同一のアミノ酸配列またはその一部が欠失もしくは置換したアミノ酸配列に1乃至複数個のアミノ酸が付加されたアミノ酸配列を含んでなるセリンプロテアーゼ

ドメインまたはその部分ペプチドを提供する。

本発明はさらに、(3) 図 7～12 (配列番号: 6) に示すアミノ酸番号 40 から 112 までのアミノ酸配列からなるクリングルドメインと同一のアミノ酸配列またはその一部が欠失もしくは置換したアミノ酸配列、あるいは該同一のアミノ酸配列またはその一部が欠失もしくは置換したアミノ酸配列に 1 乃至複数個のアミノ酸が付加されたアミノ酸配列を含んでなるクリングルドメインまたはその部分ペプチドを提供する。

本発明はさらに、(4) 図 7～12 (配列番号: 6) に示すアミノ酸番号 117 から 217 まで、番号 227 から 327 まで、番号 334 から 433 までまたは番号 447 から 547 までのアミノ酸配列からなるスカベンジャーレセプターシステインリッチ (SRCR) ドメインと同一のアミノ酸配列またはその一部が欠失もしくは置換したアミノ酸配列、あるいは該同一のアミノ酸配列またはその一部が欠失もしくは置換したアミノ酸配列に 1 乃至複数個のアミノ酸が付加されたアミノ酸配列を含んでなる SRCR ドメインまたはその部分ペプチドを提供する。

本発明はさらに、(5) 上記 (1) ～ (4) のいずれかに記載のセリンプロテアーゼ、ドメインまたはそれらの部分ペプチドをコードする DNA を提供する。

本発明はさらに、(6) 上記 (1) ～ (4) のいずれかに記載のセリンプロテアーゼ、ドメインまたはそれらの部分ペプチドをコードする DNA とストリンジェントな条件下ハイブリダイズし、かつ、セリンプロテアーゼ、ドメインまたはそれらの部分ペプチド活性を有するペプチドをコードする DNA を提供する。

本発明はさらに、(7) 前記 (5) 又は (6) に記載の DNA を含んでなる発現ベクターを提供する。

本発明はさらに、(8)前記(7)に記載の発現ベクターにより形質転換された宿主を提供する。

本発明はさらに、(9)前記(8)に記載の宿主を培養または飼育し、セリンプロテアーゼ、ドメインまたはそれらの部分ペプチドを採取することを特徴とするセリンプロテアーゼ、ドメインまたはそれらの部分ペプチドの製造法を提供する。

本発明はさらに、(10)前記(1)から(4)のいずれかに記載のセリンプロテアーゼ、ドメインまたはそれらの部分ペプチドを抗原とする抗体を提供する。

本発明はさらに、(11)前記(1)から(4)のいずれかに記載のセリンプロテアーゼ、ドメインもしくはそれらの部分ペプチドまたは前記(5)または(6)に記載のDNAを用いる生理活性物質のスクリーニング方法を提供する。

#### 図面の簡単な説明

図1はマウス・セリンプロテアーゼをコードするcDNAの塩基配列の一部分、及びそれに対応するアミノ酸配列を示す。

図2はマウス・セリンプロテアーゼをコードするcDNAの塩基配列の一部分、及びそれに対応するアミノ酸配列を示す。

図3はマウス・セリンプロテアーゼをコードするcDNAの塩基配列の一部分、及びそれに対応するアミノ酸配列を示す。

図4はマウス・セリンプロテアーゼをコードするcDNAの塩基配列の一部分、及びそれに対応するアミノ酸配列を示す。

図5はマウス・セリンプロテアーゼをコードするcDNAの塩基配列の一部分、及びそれに対応するアミノ酸配列を示す。

図6はマウス・セリンプロテアーゼをコードするcDNAの塩基配列の一部分、及びそれに対応するアミノ酸配列を示す。

図7はヒト・セリンプロテアーゼをコードするcDNAの塩基配列の一部分、及びそれに対応するアミノ酸配列を示す。

図8はヒト・セリンプロテアーゼをコードするcDNAの塩基配列の一部分、及びそれに対応するアミノ酸配列を示す。

図9はヒト・セリンプロテアーゼをコードするcDNAの塩基配列の一部分、及びそれに対応するアミノ酸配列を示す。

図10はヒト・セリンプロテアーゼをコードするcDNAの塩基配列の一部分、及びそれに対応するアミノ酸配列を示す。

図11はヒト・セリンプロテアーゼをコードするcDNAの塩基配列の一部分、及びそれに対応するアミノ酸配列を示す。

図12はヒト・セリンプロテアーゼをコードするcDNAの塩基配列の一部分、及びそれに対応するアミノ酸配列を示す。

図13は、マウスの各臓器におけるセリンプロテアーゼ遺伝子の転写を示すNorthern blottingの結果を示す電気泳動図である。

### 発明の実施の形態

マウスセリンプロテアーゼをコードするcDNAのクローニングは、先ず、常法に従って単離調製したマウス脳由来mRNAからcDNAライブラリーを作製し、次に、作製したcDNAライブラリーをセリンプロテアーゼモチーフをもとにデザインしたPCRプライマーを用いたPCRにより行なった。ここで得られたPCR産物をプローブとして、5'翻訳領域が長く新規機能タンパク質をコードすると予想されるクローンのスクリーニングを実施した。

その結果、本発明者らは、マウスBSSP-3と命名した2.7kbのcDNAを単離することに成功した。得られたcDNA配列を常法により調べた結果、マウスBSSP-3 cDNAは、セリンプロテアーゼドメインばかりでなくクリングルドメインならびにス

カベンジャーレセプターシステインリッチドメインを含む新規機能タンパク質をコードしていることが明らかとなった。単離したマウスBSSP-3 cDNAは、1つのクリングルドメイン、3つのスカベンジャーレセプターシステインリッチドメインおよび1つのセリンプロテアーゼドメインをコードしていた。具体例を実施例1に記載する。

次に、単離したマウスBSSP-3 cDNA全長をプローブとして、マウス各臓器およびマウス脳各部位におけるマウスBSSP-3 mRNAの発現を確認したところ、マウス各臓器においては、特に脳に強い発現を認め、肺および腎臓においても発現を認めた。また、マウス脳各部位においては、大脳および脳幹に強い発現を認め、延髄においても発現を認めた。その大きさはいずれの場合においても約2.7kbの大きさのみであった。検討した脳各部位のうち、マウスBSSP-3 mRNAの発現は小脳では認められなかった。具体例を実施例2に記載する。このことから、マウスBSSP-3 mRNAは、実際にマウス臓器で発現していることが確認された。

さらに、マウスBSSP-3 cDNAをプローブにしてヒト脳cDNAライブラリーをスクリーニングした結果、ヒトBSSP-3 cDNAを単離することに成功した。その結果、本発明者らは、ヒトBSSP-3 cDNAがマウスBSSP-3 cDNAの一次構造から予想されるものとは明らかに異なり、1つのクリングルドメイン、4つのスカベンジャーレセプターシステインリッチドメインおよび1つのセリンプロテアーゼドメインをコードしていることを明らかにした。具体例を実施例3に記載する。さらに、本発明者は、ヒトBSSP-3 cDNAのうちセリンプロテアーゼ成熟タンパク質をコードするDNAをCOS-1細胞で発現したところ、

明らかに酵素活性を持つ機能タンパク質であることを明らかにした。具体例を実施例4に記載する。

以上の結果から、今回単離したマウスおよびヒトBSSP-3 cDNAは、その一次構造上、新規セリンプロテアーゼドメイン、新規クリングルドメインならびに新規スカベンジャー受容体ドメインを含む新規機能タンパク質をコードしていることばかりでなく、セリンプロテアーゼドメインが酵素活性を持った機能タンパク質であることが明らかとなった。

本発明における新規機能タンパク質は、一次構造上複合的な機能を有することが明らかであるばかりでなく、その複合的な機能を通して脳内の生理機能に一定の役割を果たしている。したがって、本発明のマウスBSSP-3 cDNAおよびマウスBSSP-3 cDNAがコードしている新規機能タンパク質は、各種マウス疾患モデルの病態解析に有用な手段を提供するものである。また、病態解析を通じて得られた疾患治療のための有用な情報を基に、本発明のヒトBSSP-3 cDNAおよびヒトBSSP-3 cDNAがコードしている新規機能タンパク質は、各種疾患治療剤をスクリーニングする手法を提供するものであり、さらに実際のヒト疾患治療薬の開発に適用することも可能である。

その治療法としては、遺伝子組換え体投与による補充治療ならびにセンス又はアンチセンス法による遺伝子発現促進又は抑制治療が挙げられる。さらに、新規機能タンパク質の各ドメイン構造のそれぞれは、単独で機能することもまた可能である。したがって、各ドメイン構造を個別に発現させた後、各ドメイン構造と相互作用を示す分子を特定することができる。また、特定した分子群の疾患への関与を調べることにより、遺伝子組換え体投与による補充治療ならびにセンス又はアンチセンス法による遺伝子発現促進又は抑制治療

も可能である。

以下、実施例に基づいて本発明を説明する。

本発明においては、新規セリンプロテアーゼをコードするDNAのヌクレオチド配列として図1～6（配列番号：3）および図7～12（配列番号：5）に示すヌクレオチド配列を開示するが、本発明のセリンプロテアーゼのDNAはこれに限定されない。一旦、天然セリンプロテアーゼのアミノ酸配列が決定されれば、コドンの縮重に基き、同じアミノ酸配列をコードする種々のヌクレオチド配列を設計し、それを調製することができる。この場合、使用すべき宿主により高頻度で用いられるコドンを使用するのが好ましい。

本発明の天然セリンプロテアーゼをコードするDNAを得るには、実施例に記載する様にしてcDNAを得ることができるが、これに限定されない。すなわち、天然セリンプロテアーゼのアミノ酸配列をコードする1つのヌクレオチド配列が決定されれば天然セリンプロテアーゼをコードするDNAは、本発明に具体的に開示するストラテジーとは異なるストラテジーによりcDNAとしてクローニングすることができ、さらにはそれを生産する細胞のゲノムからクローニングすることもできる。

例えば、実施例1に示すようなDNA（ヌクレオチド）プライマーを用いるポリメラーゼ連鎖反応法（PCR）によりクローニングすることができる。

本発明のDNAはさらにセリンプロテアーゼ活性を有する蛋白または糖蛋白をコードし、図1～6（配列番号：3）または図7～12（配列番号：5）のヌクレオチド配列とハイブリダイズするDNAも含まれる。また、ハイブリダイゼーションの一般的な方法は当業者においてよく知られており（例えば、実験医学臨時増刊号、羊土社、“バイオテクノロジー実験法シリーズ遺伝子工学総集編”、Vo

1.5, No. 11, 24-60, 1987)、活性測定もまた当業者によく知られている。

ゲノムからクローニングする場合、実施例において使用した種々のプライマースクレオチド又はプローブスクレオチドを、ゲノムDNA断片の選択のためプローブとして使用することができる。また、図1～6（配列番号：3）または図7～12（配列番号：5）に記載するスクレオチド配列に基いて設計された他のプローブを用いることもできる。ゲノムから目的とするDNAをクローニングするための一般的な方法は当業界においてよく知られている（*Current Protocols In Molecular Biology*, John Wiley & Sons社、第5章及び第6章）。

本発明の天然セリンプロテアーゼをコードするDNAはまた、化学合成によっても調製することができる。DNAの化学合成は当業界において自動DNA合成機、例えばアプライドバイオシステム社396DNA/RNA合成機など採用して容易である。従って、当業者は、図1～6（配列番号：3）または図7～12（配列番号：5）に示されるスクレオチド配列のDNAを容易に合成することができる。

本発明の天然型セリンプロテアーゼを生来のコドンとは異なるコドンによりコードするDNAは、前記のごとく化学合成により調製することもでき、また図1～6（配列番号：3）または図7～12（配列番号：5）に示すスクレオチド配列を有するDNA又はRNAを鋳型として変異誘発プライマーと共に用いる部位特定変異誘発法（site-directed mutagenesis）等常法に従って得ることもできる（例えば、*Current Protocols In Molecular Biology*, John Wiley & Sons社、第8章を参照のこと）。

こうして、一旦アミノ酸配列が決定されれば、この天然アミノ酸

配列に 1 ～ 複数のアミノ酸が付加されておりなおセリンプロテアーゼ活性を維持しているポリペプチド、前記天然アミノ酸配列から 1 ～ 複数個のアミノ酸が除去されておりなおセリンプロテアーゼ活性を維持しているポリペプチド、前記天然アミノ酸配列中の 1 ～ 複数個のアミノ酸が他のアミノ酸により置き換えられておりなおセリンプロテアーゼ活性を維持しているポリペプチド、さらには、上記のアミノ酸付加変異、アミノ酸除去変異及びアミノ酸置換変異が組合わされた変異を有しなおセリンプロテアーゼ活性を維持しているポリペプチドなど、種々の変異型セリンプロテアーゼを設計し、それを製造することができる。

上記アミノ酸の付加、除去及び置換等の変異におけるアミノ酸の数は、特に限定されないが、付加については、例えば、本発明のセリンプロテアーゼとのハイブリッド蛋白に用いられる機能性蛋白のアミノ酸の数（例えば、マルトースバインディングプロテイン（*m a l t o s e - b i n d i n g p r o t e i n*）等の公知の抽出精製もしくは安定化用蛋白または各種生理活性蛋白や本セリンプロテアーゼに付加されたシグナルペプチドのそれに依存し、すなわち、当該変異の目的に依存して決定される。例えば、1 ～ 50、好ましくは、1 ～ 10 の付加があげられる。

また、除去については、除去されるアミノ酸の数は、セリンプロテアーゼ活性が維持されるように設計、決定され、例えば、1 ～ 30、好ましくは 1 ～ 20、また、本セリンプロテアーゼの活性領域以外の領域のアミノ酸の数があげられる。さらに、置換については、置換されるアミノ酸の数は、セリンプロテアーゼ活性が維持されるように設計、決定され、例えば、1 ～ 10、好ましくは、1 ～ 5 があげられる。

また、本発明においては、図 1 ～ 6（配列番号：4）または図 7

～12（配列番号：6）に示すそれぞれアミノ酸番号517から761までまたは578から822までのアミノ酸配列からなるセリンプロテアーゼドメイン、図1～6（配列番号：4）または図7～12（配列番号：6）に示すそれぞれアミノ酸番号85から157までまたは40から112までのアミノ酸配列からなるクリングルドメイン、または図1～6（配列番号：4）または図7～12（配列番号：6）に示すそれぞれアミノ酸番号166から266まで、番号273から372までもしくは番号386から486までまたは番号117から217まで、番号227から327まで、番号334から433まで、もしくは番号447から547までのアミノ酸配列からなるスカベンジャー・レセプターシスティンリッチ（S R C R）ドメインを提供し、これらドメインの作製は、後記する方法またはそれ自体公知のペプチド合成法もしくは適当なプロテアーゼによる該セリンプロテアーゼの切断により行うことができ、また本発明のドメインの活性を維持する変異型ドメインまたはそれをコードするDNAも同様に作製することができる。

上記のようにして本発明のセリンプロテアーゼまたはドメインのDNAが得られると、これを用いて、常用の遺伝子組換え法により組換えセリンプロテアーゼまたはドメインを製造することができる。すなわち、本発明のセリンプロテアーゼまたはドメインをコードするDNAを適当な発現ベクターに挿入し、該発現ベクターを適当な宿主細胞に導入し、該宿主細胞を培養し、そして得られた培養物（細胞又は培地）から目的とするセリンプロテアーゼまたはドメインを摂取する。

本発明のセリンプロテアーゼまたはドメインは、生化学的又は化学的な修飾、例えば、N末端アシル化、例えばホルミル化、アセチル化などのC<sub>1-6</sub>アシル化または欠失等がされた形で得られてもよ

い。発現系は、シグナル配列の付加、改良や宿主の選択によって分泌効率及び発現量の向上を図ることもできる。シグナル配列の付加及び改良手段としては、他の構造ペプチドのシグナルペプチドをコードする遺伝子を本発明のセリンプロテアーゼまたはドメインの構造遺伝子 5' 側上流に、切断可能な部分ペプチドをコードする遺伝子を介するように連結する方法が挙げられる。具体的例示としては、実施例 4 に記載したトリプシン遺伝子のシグナル配列およびエンテロキナーゼ認識配列をコードする遺伝子を用いる方法があげられる。

宿主としては原核生物又は真核生物を用いることができる。原核生物としては細菌、特に大腸菌 (E s c h e r i c h i a c o l i)、バシルス属 (B a c i l l u s) 細菌、例えばバシルス・ズブチリス (B. s u b t i l i s) 等を用いることができる。真核生物としては酵母、例えばサッカロミセス (S a c c h a r o m y c e s) 属酵母、例えばサッカロミセス・セレビシエー (S. s e r e v i s i a e)、等の真核性微生物、昆虫細胞、例えば、ヨガ細胞 (S p o d o p t e r a f r u g i p e r d a)、キャベツルーパー細胞 (T r i c h o p l u s i a n i)、カイコ細胞 (B o m b y x m o r i)、動物細胞、例えばヒト細胞、サル細胞、マウス細胞等、具体的には、C O S - 1 細胞、V e r o 細胞、C H O 細胞、L 細胞、ミエローマ細胞、C 1 2 7 細胞、B A L B / c 3 T 3 細胞、S p - 2 / O 細胞等を使用することができる。本発明においてはさらに、生物体それ自体、例えば昆虫、例えばカイコ、キャベツルーパー等を用いることもできる。

発現ベクターとしては、プラスミド、ファージ、ファージミド、ウィルス (バキュロ (昆虫)、ワクチニア (動物細胞) ) 等が使用できる。発現ベクター中のプロモーターは宿主細胞に依存して選択

され、例えば細菌用プロモーターとしては lac プロモーター、 trp プロモーター等が使用され、酵母用プロモーターとしては、例えば、 adh I プロモーター、 pck プロモーター等が使用される。

また、昆虫用プロモーターとしてはバキュロウィルス polyhedrin プロモーター等、動物細胞としては Simian Virus 40 の early もしくは late プロモーター、 CMV プロモーター、 HSV-TK プロモーターまたは SRα プロモーター等があげられる。また、発現ベクターには、以上その他にエンハンサー、スプライシングシグナル、ポリ A 付加シグナル、選択マーカー（例えばジヒドロ葉酸還元酵素遺伝子（メトトレキセート耐性）、 neo 遺伝子（G 418 耐性）等）等を含有しているのを用いるのが好ましい。なお、エンハンサーを使用する場合、例えば SV 40 のエンハンサー等を遺伝子の上流または下流に挿入する。

発現ベクターによる宿主の形質転換は、当業界においてよく知られている常法により行うことができ、これらの方法は例えば、 Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons 社、に記載されている。形質転換体の培養も常法に従って行うことができる。培養物からのセリンプロテアーゼまたはドメインの精製は、タンパク質を単離・精製するための常法に従って、例えば、限外濾過、各種カラムクロマトグラフィー、例えばセファロースを用いるクロマトグラフィー等により行うことができる。

このようにして得られる本発明のセリンプロテアーゼまたはドメインは、機能的タンパク質であることから、病態解析に有用な手段を提供し、本タンパク質を用いる生理活性物質のスクリーニングを可能とし、当該スクリーニング方法は、各種疾患治療剤の探索研究に有用である。スクリーニング方法の具体例として、例えば、ペプ

チド、タンパク質、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物のような、または、各種細胞培養上清等より得られる天然成分、各種合成化合物等の人工成分のような被験試料の生理活性の測定を行なうことにより、例えばセリンプロテアーゼ阻害物質の場合は、実施例4と同様にして、行なうことができる。

また、本発明のセリンプロテアーゼ、ドメインもしくはそれらの部分ペプチドまたは前記したセリンプロテアーゼ、ドメインもしくはそれらの部分ペプチドをコードするDNAで形質転換された宿主もしくはその細胞膜画分を使用する上記生理活性測定、結合親和性測定等も本発明のスクリーニング方法の好ましい実施態様である。

また、本発明のセリンプロテアーゼ、ドメインまたはその部分ペプチドをコードするDNAは、遺伝子組換体投与による補充治療ならびにセンスまたはアンチセンス法による遺伝子発現促進または抑制治療や生体内生理機能解明の有用な手段として提供され、解明された情報を基に新規医薬のスクリーニングにも用いられる。

さらにまた、本発明のセリンプロテアーゼ、ドメインもしくはその部分ペプチドまたはそれらをコードするDNAは、上記スクリーニング方法を実施する際に用いられる形態でキットとして提供できる。

部分ペプチドとしては、活性部位のセリン残基の近傍に存在するペプチド断片および本発明のセリンプロテアーゼまたはドメインに特異的な抗体の認識部位となり得るペプチド断片などの本発明のセリンプロテアーゼに特有の領域からなるペプチド断片を挙げることができる。なお、該部分ペプチドの作成は、本発明のセリンプロテアーゼまたはドメインについて前記した方法またはそれ自体公知のペプチドの合成法もしくは適当なプロテアーゼによる該セリンプロテアーゼまたはドメインの切断により行なうことができる。

また、上記の細胞膜画分は、本発明のセリンプロテアーゼ、ドメインまたはその部分ペプチドをコードするDNAを発現し得る宿主細胞を、発現が可能な条件下培養し、得られたセリンプロテアーゼ、ドメインまたはその部分ペプチドを含有する宿主細胞をそれ自体公知の方法で破碎した後、得られる細胞膜が多く含まれる画分のことという。

本発明のセリンプロテアーゼ、ドメインまたはその部分ペプチドを用いる生理活性物質のスクリーニング方法は、本発明のセリンプロテアーゼ、ドメインもしくはその部分ペプチドもしくはそれらをコードするDNAまたは該セリンプロテアーゼ、ドメインもしくはその部分ペプチドを含有する宿主細胞もしくはその細胞膜画分を用いて、被検試料をスクリーニングすることにより行なわれる。具体的方法として、本発明のセリンプロテアーゼ、ドメインおよびその部分ペプチドの基質、例えば、発色基質等の合成基質、放射性核種により標識された基質等、を用いる活性測定法や結合親和性測定法により行なわれる。

なお、セリンプロテアーゼ、ドメインまたはそれらの部分ペプチドを含有する宿主細胞を用いる場合、それ自体公知の方法で細胞を固定化（グルタルアルデヒド、ホルムアルデヒド等）して用いることができる。また、該セリンプロテアーゼ、ドメインまたはそれらの部分ペプチドをコードするDNAを用いる場合は、遺伝子発現促進または抑制を評価する手法、例えばルシフェラーゼ遺伝子等のレポーター遺伝子を用いて、行うことができる。

### 実施例

#### 実施例 1. プローブ用新規セリンプロテアーゼモチーフ cDNA のクローニング

(1) セリンプロテアーゼ保存領域を用いたPCR

マウス脳mRNAの調製は、RTG-T-primed first strand kit (Pharmacia) を用いて添付の文書に従って行った。得られたmRNA 5 μl (約 6 μg) にオリゴdTプライマー 2 μl (1 μg) を加え、70 °Cで10分間熱した後、氷中で急冷した。

この熱変性mRNAに、4 μlの5xFirst strand buffer (250 mM Tris-HCl pH 8.3, 375 mM KCl, 15 mM MgCl<sub>2</sub>), 1 μlの10 mM dNTP, 2 μlの0.1M DTT, ジオチルビロカーボネート (DEPC) 処理した蒸留水および5 μl (1000 U) のSuper Script II RTを加え、37 °Cで1時間反応させた。こうして得られたFirst strand cDNAをテンプレートとしてセリンプロテアーゼ保存領域を用いたPCRを行なった。

プライマーとして、活性残基 (His) 近傍のアミノ酸保存領域 (N-Val-Leu-Thr-Ala-Ala-His-Cys) を基に配列番号：1に示すオリゴマー-KY185 (5' - G TG CTC ACN GCN GCB CAY TG - 3') および活性残基 (Ser) 近傍のアミノ酸保存領域 (N-Gly-Asp-Ser-Gly-Gly-Pro-Leu) を基に配列番号：2に示すオリゴマー-KY189 (3' - C C V C T R A G D C C N C C N G G C G A - 5') をそれぞれ合成したものを用いた。Taq DNA polymerase (Amersham社) を用いてPCRを行った後、PCR反応液をpCR IIベクター (Invitrogen社) にサブクローニングした。

(2) スクリーニング用マウス脳mRNAの単離精製

マウス脳mRNAの調製は、Fast Track mRNA

Isolation kit (Invitrogen社) を用いて添付の文書に従って行った。すなわち、摘出したマウスの全脳に 15 ml の Lysis Buffer を加え、テフロンホモジナイザーでただちにホモジナイズした。ホモジナイズした組織は、注射筒を用いて 21 ゲージの注射針に 3 回通したのち、50 ml の遠心管に入れ、45 °C の水浴中で 1 時間インキュベーションした。

インキュベーション後、4000 × g で 5 分間遠心して得られた上清を別の 50 ml の遠心管に入れ、そこに 5 M NaCl 溶液を 950 μl 加えた後、再び注射筒を用いて 21 ゲージの注射針に 3 回通した。次に、この溶液にオリゴ (dT) セルロースを 1 錠加え、2 分間膨潤させた後、1 時間ゆっくり振動させた。1 時間後、2,000 × g で 5 分間遠心し、上清を吸引した後、20 ml の結合緩衝液に懸濁後、遠心した沈渣をさらに 10 ml の結合緩衝液で洗浄した。

次に、10 ml の低塩濃度洗浄液で 3 回洗浄した。最終洗浄後、オリゴ (dT) セルロースを 800 μl の低塩濃度洗浄液に懸濁し、スピンドルカラムに入れ、5000 × g で 10 秒間の遠心洗浄を 3 回繰り返した。洗浄後、200 μl の溶離緩衝液を加え、5000 × g で 10 秒間の遠心を 2 回繰り返すことにより 400 μl の mRNA 溶液を得た。mRNA 溶液から常法に従い、エタノール沈殿により mRNA を回収し、20 μl の DEPC 処理した蒸留水に溶解した。

### (3) cDNA ライブライマーからのスクリーニング

#### 〈工程 1〉 cDNA の合成

実施例 1 (2) で得られた mRNA 5 μl (約 6 μg) にオリゴ dT Not I プライマー 2 μl (1 μg) を加え、70 °C で 10 分間熱した後、氷中で急冷した。この熱変性 mRNA に、4 μl の

5 x 第一鎖緩衝液 (250 mM Tris-HCl pH 8.3, 375 mM KCl, 15 mM MgCl<sub>2</sub>), 1 μl の 10 mM dNTP, 2 μl の 0.1 M DTT, DEPC 处理した蒸留水および 5 μl (1000 U) の Super Script II RT を加え、37 °C で 1 時間反応させた。

次に、この反応液に 91 μl の DEPC 处理した蒸留水、30 μl の 5 x 第二鎖緩衝液 (100 mM Tris-HCl pH 6.9, 450 mM KCl, 23 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.75 mM β-NAD+, 50 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), 3 μl の 10 mM dNTP, 1 μl (10 U) の大腸菌 DNA リガーゼ、4 μl (40 U) の大腸菌 DNA ポリメラーゼおよび 1 μl (2 U) の大腸菌 RNase H を加え、16 °C で 2 時間反応後、2 μl (10 U) の T4 DNA ポリメラーゼを加え 16 °C で 5 分間反応させた。

さらに、この溶液に 10 μl の 0.5 M EDTA を加えて混合した後、150 μl のフェノール：クロロホルム：イソアミルアルコール (25:24:1) を加え、攪拌後 15, 000 rpm で 5 分間遠心し、上清を回収した。得られた上清に、10 μl の 5 M KOAc, 400 μl のエタノールを加え攪拌し、15, 000 rpm で 10 分間遠心した。遠心して得られた沈殿物を 500 μl の 70% エタノールで洗い、軽く風乾後、25 μl の DEPC 处理した蒸留水に溶解した。

#### 〈工程 2〉 Eco RI アダプターの付加

前工程で得られた 2 本鎖 cDNA 25 μl に 10 μl の 5 × T4 DNA 連結緩衝液 (250 mM Tris-HCl pH 7.6, 50 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM ATP, 5 mM DTT, 2.5% (w/v), PEG 8000), Eco RI アダプター溶液 1.0

$\mu$  1 (10  $\mu$  g) および 5  $\mu$  1 (5 U) の T 4 DNA ligase を加え、16 °C にて 16 時間反応後、50  $\mu$  1 のフェノール：クロロホルム：イソアミルアルコール (25 : 24 : 1) を加え、攪拌後 15, 000 rpm で 5 分間遠心し、上清を回収した。回収した上清に、5  $\mu$  1 の 5 M KOAc, 125  $\mu$  1 のエタノールを加え攪拌し、-80 °C, 20 分間冷却後、15, 000 rpm で 10 分間遠心した。遠心して得られた沈殿物を 200  $\mu$  1 の 70% エタノールで洗い、軽く風乾後、40  $\mu$  1 の DEPC 处理した蒸留水に溶解した。

#### 〈工程 3〉 $\lambda$ gt 10 とのライゲーション

サイズ分画した cDNA 溶液 3 ml に  $\lambda$  gt 10 (Eco RI 切断) 1  $\mu$  1 (50 ng) を加え、11  $\mu$  1 の DEPC 处理した蒸留水、4  $\mu$  1 の 5 × T 4 DNA 連結緩衝液、1  $\mu$  1 の 5 × T 4 DNA リガーゼを加え室温で 3 時間反応させた。フェノール：クロロホルム：イソアミルアルコール (25 : 24 : 1) 抽出を行い、5  $\mu$  1 (5  $\mu$  g) の yeast tRNA, 5  $\mu$  1 の 5 M KOAc および 125  $\mu$  1 のエタノールを加え攪拌し、-80 °C 20 分間冷却後、15, 000 rpm で 10 分間遠心した。遠心して得られた沈殿物を 200  $\mu$  1 の 70% エタノールで洗い、軽く風乾後、5  $\mu$  1 の TE (10 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 mM EDTA) に溶解した。

#### 〈工程 4〉 パッケージング

工程 3 で得られたライゲーション後 cDNA を Gigapack Packaging Extracts (Stratagene) を用いてパッケージングした。すなわち、0.1  $\mu$  g/ $\mu$  l のライゲーション後 cDNA 溶液 1  $\mu$  l にキット添付の Freeze-thaw Extract 10  $\mu$  l を加えた後、さらに、キット

添付の S o n i c E x t r a c t 15  $\mu$  l を直ちに加えよく攪拌した。室温で 2 時間放置後、500  $\mu$  l のファージ希釈緩衝液 (100 mM NaCl, 10 mM MgSO<sub>4</sub>, 50 mM Tris/HCl pH 7.5, 0.01% ゼラチン) を加え、さらに、20  $\mu$  l のクロロホルムを加えた。よく混和した後、室温で 15000 rpm, 5 分間遠心した上清を回収し、ファージ液を得た。常法に従い、このファージ液はタイトレーション後、ホスト大腸菌に感染させた。

#### 〈工程 5〉ライブラリーのスクリーニング

実施例 1 (1) で得られた DNA 断片を B c a B e s t - D N A labeling kit (Takara) を用いて  $\alpha$ -<sup>32</sup>P d CTP で標識し、プローブを作製した。このプローブを用い、前工程で得られた約 40 万クローンの cDNA ライブラリーをスクリーニングした。その結果、約 40 万個のクローンから、挿入 DNA 断片の最も長いクローン pUC18/mBSSP-3/1-1 を得た。

pUC18/mBSSP-3/1-1 の cDNA の全長は 2,597 塩基対で、244 塩基対の 5' 非翻訳領域、2283 塩基対の翻訳領域、70 塩基対の 3' 非翻訳領域から成り、その翻訳領域はセリンプロテアーゼドメイン (アミノ酸番号: 517 ~ 761) をコードするばかりでなくクリングルドメイン (アミノ酸番号: 85 ~ 157) ならびにスカベンジャー-レセプターシステインリッチドメイン (アミノ酸番号 ドメイン 1: 166 ~ 266、ドメイン 2: 273 ~ 372、ドメイン 3: 386 ~ 486) を含む新規機能タンパク質をコードしていることが明らかとなった。pUC18/mBSSP-3/1-1 の cDNA の塩基配列および対応するアミノ酸配列を図 1 ~ 6 (配列番号: 3) に示した。

実施例 2 . m B S S P - 3 の N o r t h e r n b l o t t i n g による発現部位の検討

マウス脳の total RNA は、トリゾル試薬（ライフテクノロジー）を用いて添付の文書に従って調製した。すなわち、マウスの大脳、脳幹、小脳および延髄を摘出したのちポリトロンでただちにホモジナイズし、組織容量の 10 倍量（約 3 ml）のトリゾル試薬を加えることにより組織を溶解した。さらに、クロロホルム 600  $\mu$ l を加えて攪拌し、15,000 rpm, 4°C で 15 分間遠心した。遠心後、水相を回収し、回収した水相に 1500  $\mu$ l のイソプロパノールを加えて攪拌し、15,000 rpm, 4°C で 30 分間遠心した。

得られたマウスの脳の各部位の全 RNA の沈殿を 400  $\mu$ l の D E P C 処理した蒸留水に溶解した後、常法に従いメンブランフィルターにプロットした。次に、pUC18 / mBSSP-3 / 1-1 を制限酵素 EcoRI で消化し、約 2.7 kbp の DNA 断片を単離・精製し、前述の方法で  $\alpha$ -<sup>32</sup>P-dCTP で標識することによりプローブを作製した。

このプローブを前述のマウス脳各部位から調製した total RNA をプロットしたメンブランフィルターおよび市販の各種臓器から調製した mRNA をプロットしたメンブランフィルター（クロンテック社）と 55°C で一晩ハイブリダイズさせた後、それぞれのメンブランフィルターを 0.1% SDS を含む 2 x SSC (150 mM NaCl, 15 mM Sodium citrate) で室温、20 分間、続いて、0.1 x SSC, 0.1% SDS に替え 65°C, 30 分間で 2 回洗い、BAS2000 用イメージングプレート（富士写真フィルム）に 30 分間露光させた。

その結果を図 1-3 に示した。各臓器の発現では、脳、肺および腎

臓で発現していることが確認された。脳の各部位では、大脳および脳幹で強い発現を認め、また、延髄でも弱い発現を認めたが、小脳での発現は認められなかった。発現は、いずれの場合も約 2.7 kb p の大きさのみであった。

#### 実施例 3. ヒト B S S P - 3 cDNA のクローニング

ヒト脳 cDNA ライブラリーは、クロンテック社より購入した。マウス B S S P - 3 cDNA 断片をグルタールアルデヒドを用いて蛍光標識し、プローブを作製した。このプローブを用い、約 40 万クローンのヒト脳 cDNA ライブラリーをスクリーニングした結果、p U C 1 8 / h B S S P - 3 を得た。

p U C 1 8 / h B S S P - 3 cDNA の翻訳領域は、マウス B S S P - 3 cDNA と同様にセリンプロテアーゼドメイン（アミノ酸番号：578～822）をコードするばかりでなくクリングルドメイン（アミノ酸番号：40～112）ならびにスカベンジャー受容体リセプターシステインリッチドメイン（アミノ酸番号 ドメイン 1 : 117～217、ドメイン 2 : 227～327、ドメイン 3 : 334～433、ドメイン 4 : 447～547）を含む機能タンパク質をコードしていることが明らかとなった。

しかしながら、マウス B S S P - 3 cDNA の一次構造から予想されるものとは明らかに異なり、スカベンジャー受容体リセプターシステインリッチドメインがマウス B S S P - 3 では 3 つであるのに対して、ヒト B S S P - 3 は 4 つであることが明らかとなった。p U C 1 8 / h B S S P - 3 の塩基配列および対応するアミノ酸配列を図 7～12（配列番号：5）に示す。

#### 実施例 4. ヒト B S S P - 3 cDNA がコードする新規セリンプロテアーゼ成熟タンパク質の酵素活性の測定

##### （1）発現プラスミドの構築

pUC18/hBSSP-3のDNA断片とpdKCRベクターDNA断片を常法に従いライゲーションし、大腸菌JM109を形質転換させ、生じたコロニーをPCR法により解析して目的とするセリンプロテアーゼhBSSP-3発現プラスミドpdKCR/hBSSP-3を得た。

次に、トリプシンIIの開始メチオニンに続くシグナル配列ならびにエンテロキナーゼ認識配列をコードする遺伝子を増幅し、かつ5'側上流にEcoRI, 3'側下流にBspMI制限酵素認識部位を付加するようにプライマーを設計した。これらプライマーを用い、PCR/TrypsinIIプラスミドをテンプレートとしたPCRを行い、その産物を制限酵素(EcoRIおよびBspMI)で消化後、約75bpのDNA断片を単離・精製した。同様に、ヒトBSSP-3の成熟タンパク質をコードするDNAの上流にBspMI制限酵素認識部位を付加するようにデザインしたプライマーを用い、pdKCR/hBSSP-3をテンプレートとしたPCRを行い、その産物を制限酵素(BspMIおよびBpu1102I)で消化後、DNA断片を単離・精製した。

次に、得られたトリプシンIIのシグナル配列ならびにエンテロキナーゼ認識配列をコードするDNA断片とヒトBSSP-3の成熟タンパク質をコードするDNA断片を、常法に従い、制限酵素(BspMIおよびBpu1102I)で前消化したpdKCR/hBSSP-3ベクターにライゲーションし、大腸菌JM109を形質変換させた。形質変換したコロニーのうち目的とするキメラDNAを含むコロニーをPCR法により確認し、発現プラスミド(pdKCR/Trp-hBSSP-3)を得た。

## (2) COS-1細胞における発現

実施例4(1)で作製したキメラ遺伝子DNAをリポフェクチン

(Life Technologies) を用いて COS-1 細胞にトランスフェクションした。すなわち、直径 10 cm の培養用ディッシュ (Corning, 430167) に 10 % ウシ胎児血清を含むダルベコの最少必須培地 (DMEM, 日水製薬) で COS-1 細胞を  $5 \times 10^5$  細胞植え込んだ。翌日、 Opti-MEM 培地 (Life Technologies) 5 ml で細胞をリノンスした後、新しい 5 ml の Opti-MEM 培地を加え、 37 °C で 2 時間培養した。

培養後、ディッシュ 1 枚あたり、上述のプラスミド 1  $\mu$ g およびリポフェクチン 5  $\mu$ g の混液を加え、 37 °C で 5 時間培養した。培養後、 Opti-MEM 培地を 5 ml 加え、合計 10 ml とし、 37 °C で 72 時間培養した。培養後、遠心操作により培養上清を集め、酵素活性の測定サンプルとした。また、コントロールとして、発現プラスミド p dKCR のみを COS-1 細胞にトランスフェクションした培養上清も調製した。

### (3) 酵素活性の測定

実施例 4 (2) で得られた培養上清中の酵素活性を測定した。すなわち、 COS-1 細胞の培養上清 45  $\mu$ l にエンテロキナーゼ (10 mg/ml, Biozyme Laboratories) 5  $\mu$ l を混和し、 37 °C で 2 時間反応させた。次に、 DMSO に溶解した合成基質 Boc-Phe-Ser-Arg-MCA (ペプチド研究所) を 0.1 M Tris/HCl, pH 8.0 で希釈した 0.2 mM 基質溶液を 50  $\mu$ l 加え、 4 °C で 16 時間反応させた。反応後、励起波長 485 nm、蛍光波長 535 nm における蛍光を測定した。その結果、 Trp-hBSSP-3 を発現した COS-1 細胞の培養上清をエンテロキナーゼ消化した時にのみ、酵素活性を認めた。

以上の結果から、ヒト BSSP-3 のセリンプロテアーゼドメイ

ンは、酵素活性を持つ機能タンパク質であることが明らかとなつた。

### 発明の効果

本発明者らは、マウス脳 c DNA ライブラリーから新規セリンプロテアーゼドメインばかりでなく新規クリングルドメインならびに新規スカベンジャーレセプターシステインリッチドメインを含む新規機能タンパク質をコードするマウス B S S P - 3 c DNA を単離した。単離したマウス B S S P - 3 c DNA は、1 つのクリングルドメイン、3 つのスカベンジャーレセプターシステインリッチドメインおよび1 つのセリンプロテアーゼドメインをコードしていた。また、単離したマウス B S S P - 3 m RNA の発現部位の検討結果から、本発明者らは、マウス B S S P - 3 m RNA が脳に強く発現していること、脳のうち特に大脳および脳幹で強く発現していることを明らかにした。

次に、マウス B S S P - 3 c DNA をプローブにして、ヒト脳 c DNA ライブラリーからヒト B S S P - 3 c DNA を単離することに成功した。その結果、本発明者らは、ヒト B S S P - 3 c DNA がマウス B S S P - 3 c DNA の一次構造から予想されるものとは明らかに異なり、1 つのクリングルドメイン、4 つのスカベンジャーレセプターシステインリッチドメインおよび1 つのセリンプロテアーゼドメインをコードしていることを明らかにした。

さらに本発明者らは、ヒト B S S P - 3 c DNA のうちセリンプロテアーゼ成熟タンパク質をコードする DNA を C O S - 1 細胞で発現したところ、明らかに酵素活性を持つ機能タンパク質であることを明らかにした。本発明における新規機能タンパク質は、一次構造上複合的な機能を有することが明らかであるばかりでなく、そ

の複合的な機能を通して脳内の生理機能に一定の役割を果たしている。したがって、本発明のマウスBSSP-3 cDNAおよびマウスBSSP-3 cDNAがコードしている新規機能タンパク質は、各種マウス疾患モデルの病態解析に有用な手段を提供するものである。

また、病態解析を通じて得られた疾患治療のための有用な情報を基に、本発明のヒトBSSP-3 cDNAおよびヒトBSSP-3 cDNAがコードしている新規機能タンパク質は、各種疾患治療剤をスクリーニングする手段を提供するものであり、さらに実際のヒト疾患治療薬の開発に適用することも可能である。その治療法としては、遺伝子組換え体投与による補充治療ならびにセンス又はアンチセンス法による遺伝子発現促進又は抑制治療が挙げられる。

さらに、新規機能タンパク質の各ドメイン構造のそれぞれは、単独で機能することもまた可能である。したがって、各ドメイン構造を個別に発現させた後、各ドメイン構造と相互作用を示す分子を特定することができる。また、特定した分子群の疾患への関与を調べることにより、遺伝子組換え体投与による補充治療ならびにセンス又はアンチセンス法による遺伝子発現促進又は抑制治療も可能である。

## 請求の範囲

1. 配列番号：6に示すセリンプロテアーゼと同一のアミノ酸配列またはその一部が欠失もしくは置換したアミノ酸配列、あるいは該同一のアミノ酸配列またはその一部が欠失もしくは置換したアミノ酸配列に1乃至複数個のアミノ酸が付加されたアミノ酸配列を含んでなるセリンプロテアーゼまたはその部分ペプチド。
2. 配列番号：6に示すアミノ酸番号578から822までのアミノ酸配列からなるセリンプロテアーゼドメインと同一のアミノ酸配列またはその一部が欠失もしくは置換したアミノ酸配列、あるいは該同一のアミノ酸配列またはその一部が欠失もしくは置換したアミノ酸配列に1乃至複数個のアミノ酸が付加されたアミノ酸配列を含んでなるセリンプロテアーゼドメインまたはその部分ペプチド。
3. 配列番号：6に示すアミノ酸番号40から112までのアミノ酸配列からなるクリングルドメインと同一のアミノ酸配列またはその一部が欠失もしくは置換したアミノ酸配列、あるいは該同一のアミノ酸配列またはその一部が欠失もしくは置換したアミノ酸配列に1乃至複数個のアミノ酸が付加されたアミノ酸配列を含んでなるクリングルドメインまたはその部分ペプチド。
4. 配列番号：6に示すアミノ酸番号117から217まで、番号227から327まで、番号334から433までまたは番号447から547までのアミノ酸配列からなるスカベンジャー・レセプターシステインリッチ(SRCR)ドメインと同一のアミノ酸配列またはその一部が欠失もしくは置換したアミノ酸配列、あるいは該同一のアミノ酸配列またはその一部が欠失もしくは置換したアミノ酸配列に1乃至複数個のアミノ酸が付加されたアミノ酸配列を含んでなるSRCRドメインまたはその部分ペプチド。

5. 請求項 1 から 4 のいずれか 1 項に記載のセリンプロテアーゼ、ドメインまたはそれらの部分ペプチドをコードする D N A。
6. 請求項 1 から 4 のいずれか 1 項に記載のセリンプロテアーゼ、ドメインまたはそれらの部分ペプチドをコードする D N A とストリンジエントな条件下でハイブリダイズし、かつ、セリンプロテアーゼ、ドメインまたはそれらの部分ペプチド活性を有するペプチドをコードする D N A。
7. 請求項 5 または 6 に記載の D N A を含んでなる発現ベクター。
8. 請求項 7 に記載の発現ベクターにより形質転換された宿主。
9. 請求項 8 に記載の宿主を培養または飼育し、セリンプロテアーゼ、ドメインまたはそれらの部分ペプチドを採取することを特徴とするセリンプロテアーゼ、ドメインまたはそれらの部分ペプチドの製造法。
10. 請求項 1 から 4 のいずれか 1 項に記載のセリンプロテアーゼ、ドメインまたはそれらの部分ペプチドを抗原とする抗体。
11. 請求項 1 から 4 のいずれか 1 項に記載のセリンプロテアーゼ、ドメインもしくはそれらの部分ペプチドまたは請求項 5 または 6 に記載の D N A を用いる生理活性物質のスクリーニング方法。

## Fig. 1

CGAGGGGTGGAGGGTGGACTCCGGGCTACAGAGCTCCTGGCGCTCATCGCCTCTGG	60
CTCCAGCCTTGTGCTTGGTCCGGCTGACCCCTTGTGGTCCGGCTGATCCTCCAGCTGCC	120
CGGGGCTGGACAGCAGGGGGGGGGGGGGGGGGGGCTAGGACTCTGGCG	180
GCCCCGG	240
AGCC	244
ATGGCGCTCGCCCCGGCTGGCTGGCTGGTGAATTAGGGGCACCTGCTGTAGTGGCC	301
MetAlaLeuAlaArgCysValLeuAlaValIleLeuGlyAlaLeuSerValValAla	19
CGCGCTGATCCGGGTCTCGGGCTCTCCCTTCACCGCCGGCATCCGGCCCCACCGCGTCC	361
ArgAlaAspProValSerArgSerProLeuHisArgProSerProProArgSer	39
CAACACGGCAACTACCTTCCAGCTGGGGGCCACCCAGGACCCGGCTTCCCGCTC	421
GlnHisAlaHistYrLeuProSerSerArgArgProProArgThrProArgPheProLeu	59
CCGGCTGGGATCCCCGGCTGCCAGGGTCTCAGCACCGGGCACACGCC	481
ProLeuArgIleProAlaAlaGlnArgProGlnValLeuSerThrGlyHisThrProPro	79
ACGATTCCACGCCGCTGGGGGGCAGGAGTCGTGGGAAATGCCAACCTCGGGGTC	541
ThrIleProArgArgCysGlyAlaGlyGluSerTrpGlyAsnAlaThrAsnLeuGlyVal	99
CCGTGTCTACACTGGGACGGGGTGCCTGGAGGGCTTCCTGGAGCGGGTCTGCCAGTTGG	601
ProCysLeuHisTrpAspGluValProProPheLeuGluArgSerProProAlaSerTrp	119

## Fig. 2

GCTGAGGCTGCCGAGCCGACAACTTCTGCCGGATGGCTCGGGCAGACCT	661
AlaGluLeuArgGlyGlnProHisAsnPheCysArgSerProAspGlySerGlyArgPro	139
TGGTGCTTCATCGGAATGCCAGGGCAAAGTAGACTGGCTACTGGATTTGGTCAA	721
TrpCysPheTyrArgAsnAlaGlnGlyLysValAspTrpGlyTyrCysAspCysGlyGln	159
GGCCCGGCGTTGCCCGTCATTCGCCCTGTTGGTGGAACAGTGGCATGAAAGGTGAGTG	781
GlyProAlaLeuProValIleArgLeuValGlyGlyAsnSerGlyHisGluGlyArgVal	179
GAGCTGTACACGCCAGTGGCCAGTGGGGACCATCTGTGACGACCAATGGGACAATGGCAGAC	841
GluLeuTyrHisAlaGlyGlnTrpGlyThrIleCysAspAspGlnTrpAspAsnAlaAsp	199
GCAGACGTCATCTGTAGGCAGCTGGCTCAGTGGCATTGCCAAAGCATGGCATCAGGCA	901
AlaAspValIleCysArgGlnLeuGlyLeuSerGlyIleAlaLysAlaTrpHisGlnAla	219
CATTGGGAAGGATCTGCCCAATTGTTGGATGAAGTACGCTGCACCGGAAACGAG	961
HisPheGlyGluGlySerGlyProIleLeuAspGluValArgCysThrGlyAsnGlu	239
CTGTCAAATTGAGCAATGTCCAAAGAGTTCCCTGGGGCGAACATAACTGTGGCCATAAGAA	1021
LeuSerIleGluGlnCysProLyssSerTrpGlyGluHisAsnCysGlyHisLysGlu	259

## Fig. 3

GATGCTGGAGTGTCTTGTGTTCCCTAACAGATGGTGTCACTCAGACTGGCAGGGAAA	1081
AspAlaGlyValSerCysValProLeuThrAspGlyValLeuAlaGlyGlyLys	279
AGTACCCATGAAGGTCGCCCTGGAGGGTCTACTACAAAGGGCAGTGGGGACAGTCTGTGAT	1141
SerThrHisGluGlyArgLeuGluValTyrrTyrrLysGlyGlnTrpGlyThrValCysAsp	299
GATGGCTGGACTGAGATGAAACACATACGTGGCTTGTGACTGCTGGATTAAATACGGC	1201
AspGlyTrpThrGluMetAsnThrValAlaCysArgLeuLeuGlyPheLysTyrGly	319
AAACAGTCCTCTGTGAACCATTTGATGGCAGCAACAGGCCCATATGGCTGGATGACCGTC	1261
LysGlnSerSerValAsnHisPheAspGlySerAsnArgProLeTrpLeuAspAspVal	339
AGCTGCTCAGGAAAGTCAGCTTCATTCACTGTTCCAGGAGACAGTGGGAAGGCAT	1321
SerCysSerGlyLysGluValSerPheIleGlnCysSerArgArgGlnTrpGlyArgHis	359
GACTGCAGCCATAGAGAAAGATGTGGCCTCACCTGCTATCCTGACAGCGATGGACATAGG	1381
AspCysSerHisArgGluAspValGlyLeuThrCysTyrProAspSerAspGlyHisArg	379
CTTCTCCAGGTTTCCCATCAGACTAGTGGATGGAGAGATAAGGAAGGACGAGTGT	1441
LeuSerProGlyPheProLeArgLeuValAspGlyGluAsnLysLysGluGlyArgVal	399

## Fig.4

GAGGTTTTGTCAATGGCCAATGGGGAAACAATCTGGATGGACGGATAAGCATT	1501
GluValPheValAsnGlyGlnTrpGlyThrIleCysAspAspGlyTrpThrAspLysHis	419
GCAGCTGTGATCTGCCGGCAGGCTATAAGGGTCCCTGCCAGAGCAAGGACTATGGCT	1561
AlaAlaValIleCysArgGlnLeuGlyTyrLysGlyProAlaArgThrMetAla	439
TATTTTGGGAAGGAAAGGCCCCATCCACATGGATAATGTGAAGTGCACAGGAAATGAG	1621
TyrPheGlyGluGlyLysGlyProIleHisMetAspAsnValLysCysThrGlyAsnGlu	459
AAGGCCCTGGCTGACTGTGTCAAACAAAGACATTGGAAAGGCACAAACTGCCAACAGTGAG	1681
LysAlaLeuAlaAspCysValLysGlnAspIleGlyArgHisAsnCysArgHisSerGlu	479
GATGCAGGAGTCATCTGTGACTATTAGAGAAGAACATCAAGTAGTGGTAATAAAGAG	1741
AspAlaGlyValIleCysAspTyrLeuGluLysIysAlaSerSerGlyAsnLysGlu	499
ATGGCTCTCATCTGGATGTGGACTGAGGTTACTGCACCGTCTGGCAGAACGGATCATTTGGT	1801
MetLeuSerGlyCysGlyLeuArgLeuHisArgArgGlnLysArgIleIleGly	519
GGGAACATTCTTAAGGGGTGCCTGGCAGGGCTTCCCTCAGGCTGAGGTGGCC	1861
GlyAsnAsnSerLeuArgGlyAlaTrpProTrpGlnAlaSerLeuArgSerAla	539

## Fig. 5

CATGGAGACGGCAGGCTGCTTTGTGGAGCTACCCCTCTGAGTAGCTGGGTCCCTGACA HisGlyAspGlyArgLeuCysGlyAlaThrLeuSerSerCysTrpValLeuThr	1921 559
GCTGCACACTGCTTCAAAAGGTACGGAAACAACTCGAGGAGCTATGCAGTTCGAGTTGGG AlaAlaHisCysPhelysArgTyrGlyAsnAsnSerArgSerTyrAlaValArgValGly	1981 579
GATTATCATACTCTGGTACCAAGGGAGTTGAACAAAGAAATAAGGGTTCAACAGATTGTT AspTyrHisThrLeuValProGluGluPheGluGlnGluIleGlyValGlnGlnIleVal	2041 599
ATTCACAGGAACTACAGGCCAGACAGAAAGGCCACTATGACATTCGCCTGGTTAGATTGCAA IleHisArgAsnTyrArgProAspArgSerAspTyrAspIleAlaLeuValArgLeuGln	2101 619
GGACCAGGGAGCAATGTGCCAGACTAACGCCCCACGTTTGCCAGCCTGTTACCTCTA GlyProGlyGluGlnCysAlaArgLeuSerThrHisValLeuProAlaCysLeuProLeu	2161 639
TGGAGAGAGGCCACAGAAAACAGCCTCCAACTGTACATAACAGGATGGGAGACACA TrpArgGluArgProGlnLysThrAlaSerAsnCysHistidineThrGlyTrpGlyAspThr	2221 659
GGTCCGTGCCTACTCAAGAAACTCTACAAAGCTGCTGCTGTGGCTCTGTTACCCAAAGAGGTT GlyArgAlaTyrSerArgThrLeuGlnGlnAlaAlaValProLeuProLysArgPhe	2281 679

## Fig. 6

TGTAAAGAGGGTACAAGGGACTATTACTGGGAGAAATGCTCTGTGGGAAACCTCCAA	2341
CysLysGluArgTyrLysGlyLeuPheThrGlyArgMetLeuCysAlaGlyAsnLeuGln	699
GAAGACAACCGTGTGGACAGGTGCCAGGGAGACAGTGGAGGCCACTCATGTTGTGAAAG	2401
GluAspAsnArgValAspSerCysGlnGlyAspSerGlyGlyProLeuMetCysGluLys	719
CCTGATGAGTCCTGGGTTGTATGGGTGACTTCCTGGGGTATGGATGTGGAGTCAAA	2461
ProAspGluSerTrpValValTyrGlyValThrSerTrpGlyTyrGlyCysGlyValLys	739
GACACTCCTGGAGTTATACCAGGTCCCCGGCTTGTACCTTGGATAAAAGTGTCAACC	2521
AspThrProGlyValTyrThrArgValProAlaPheValProTrpIleLysSerValThr	759
AGTCTGTAACTTATGGAAAGCTCAAGAAAATAGTAACAGTAACCTTCAGTCTTCATA	2581
SerLeu***	761
CTTGGCACCATGCCAGAAAAAA	2614

Fig. 7.

CCGACGACGGTCCGGCCGCCGCTCTCCCCGGCTTCCGGCTCCGGCTCCCT	60
ProThrArgProProProLeuProArgPheProArgProProArgAlaLeuPro	20
GCCCCGGCCACGGCCCTCCAGGGGGCACACGCCCGGCCACCCCTGGGCTGC	120
AlaGlnArgProHisAlaLeuGlnAlaGlyHisThrProArgProHisProTrpGlyCys	40
CCCCGGGGAGCCATGGGTCAAGGGTGAAGGACTTGGCGCCCCGTTGTCTGGCG	180
ProAlaGlyGluProTrpValSerValThrAspPheGlyAlaProCysLeuArgTrpAla	60
GAGGTGCCACCCCTCCTGGAGGGTCTGGCCCCCAGCGAGCTGGCTCAGCTGGAGGACAG	240
GluValProProPheLeuGluArgSerProAlaSerTrpAlaGlnLeuArgGlyGln	80
CGCCACAACTTTGTGGAGCCCCGACGGGGCAGACCCCTGGTGTCTACGGAGAC	300
ArgHisAsnPheCysArgSerProAspGlyAlaGlyArgProTrpCysPheTyrGlyAsp	100
GCCCCGGCAAGGGTGGACTGGGCTTACTGGACTTGCAGACACGGATCAGTACGACTTCGT	360
AlaArgGlyLysValAspTrpGlyTyrCysAspCysArgHisGlySerValArgLeuArg	120
GGGGGCAAAATGAGTTGAAGGACACAGTGGAAAGTATATGCAAGTGGAGTTGGGGCACT	420
GlyGlyLysAsnGluPheGluGlyThrValGluValTyrAlaSerGlyValTrpGlyThr	140

## Fig. 8

GTCTGTAGCAGCCACTGGGATGATTCTGATGCCATTTGTCAAGTCATTGCTGGCAGGCTG	480
ValCysSerSerHisTrpAspSerAspAlaSerValIleCysHisGlnLeuGlnLeu	160
GGAGGAAAGGAATAGCAAAACACCCGGTTTCTGGACTGGCCTTATTCCCATTTAT	540
GlyGlyLysGlyIleAlaLysGlnThrProPheSerGlyLeuGlyLeuIleProIleTyr	180
TGGAGCAATGTCCGTTGCCGGAGATGAAGAAAATATACTGCTTTGTGAAAAAGACATC	600
TrpSerAsnValArgCysArgGlyAspGluGluAsnIleLeuLeuCysGluLysAspIle	200
TGGCAGGGTGGGGTGTGTCCCTCAGAAAGATGGCAGCTGCTCACGGTAGCTTTCCCAT	660
TrpGlnGlyGlyValCysProGlnLysMetAlaAlaAlaValThrCysSerPheSerHis	220
GGCCCAACGGTTCCCCATCATTCGCCCTTGCTGGAGGCAGGTGTGCATGAAGGGGGTG	720
GlyProThrPheProIleIleArgLeuAlaGlyGlySerSerValHisGluGlyArgVal	240
GAGCTCTACCATGCTGGCCAGTGGGAACCGTTGTGATGACCAATGGGATGATGCCGAT	780
GluLeuTyrHisAlaGlyGlnTrpGlyThrValCysAspAspGlnTrpAspAspAlaAsp	260
GCAGAAAGTGATCTGCAGGCAGCTGGGCCTCAGTGGCATGGCATTGGCATCAGGCA	840
AlaGluValIleCysArgGlnLeuGlyLeuSerGlyIleAlaLysAlaTrpHisGlnAla	280

## Fig.9

TATTTGGGAAAGGGTCTGGCCCAGTTATGTTGGATGAACTACGCTGGAAATGAG	900
TyrPheGlyGluglySerGlyProValMetLeuAspGluValArgCysThrGlyAsnGlu	300
CTTCAATTGAGCAGTGTCCAAGAGCTCCTGGGAGAGCATTAACCTGGCCATAAAGAA	960
LeuSerIleGluGlnCysProLysSerSerTrpGlyGluHisAsnCysGlyHisLysGlu	320
GATGCTGGAGTGTCCCTGTAACAGATGGGTCATCAGACTTGCAGGGAAA	1020
AspAlaGlyValSerCysThrProLeuThrAspGlyValIleArgLeuAlaGlyGlyLys	340
GGCAGCCATGAGGGTGGCTGGAGGTATTACAGAGGCCAGTGGGAAACTGTCTGTGAT	1080
GlySerHisGluGlyArgLeuGluValTyrrTyrrArgGlyGlnTrpGlyThrValCysAsp	360
GATGGCTGGACTGAGCTGAATAACATACGTTGTCGACAGTTGGGATTAAATAATGGT	1140
AspGlyTrpThrGluLeuAsnThrTyrrValValCysArgGlnLeuGlyPheLysTyrGly	380
AAACAAAGCATTGCCAACCATTTGAAAGAACAGGCCCATATGTTGGATGACGTC	1200
LysGlnAlaSerAlaAsnHisPheGluSerThrGlyProIleTrpLeuAspAspVal	400
AGCTGCTCAGGAAAGGAAACCAGATTCTTCAGTGTCCAGGGCGACAGTGGGAAAGGCAT	1260
SerCysSerGlyLysGluThrArgPheLeuGlnCysSerArgArgGlnTrpGlyArgHis	420

## Fig. 10

GACTGCAGCCACCGCGAAGATGTTAGCATTGCCCTGCTACCCCTGGCGGAGGGACACAGG	1320
AspCysSerHisArgGluAspValSerIleAlaCysTyrProGlyGlyGluglyHisArg	440
CTCTCTGGTTTCCTGTCAGACTGATGGAGAAATAAGAAAAGAACGGACGGTG	1380
LeuSerLeuGlyPheProValArgLeuMetAspGlyGluAsnLysLysGluglyArgVal	460
GAGGTTTATCAATGGCCAGTGGAAACAAATCTGTGATGGATGGACTGATAAGGAT	1440
GluValPheIleAsnGlyGlnTrpGlyThrIleCysAspAspGlyTyrPheAspLysAsp	480
GCAGCTGTCGATCTGTCGTCAGCTGGCTACAGGGTCCAGGCCAGACCAAGAACCATGGCT	1500
AlaAlaValIleCysArgGlnLeuGlyTyrLysGlyProAlaArgAlaArgThrMetAla	500
TACTTGGAGAAGGAAAAGGACCCATCCATGTGGATAATGTGAAGTGCACAGGAATGAG	1560
TyrPheGlyGluGlyLysGlyProIleHisValAsnValLysCysThrGlyAsnGlu	520
AGGTCTGGCTGACTGTATCAAGCAAGATATTGGAAAGACACAACTGCCGCCACAGTGAA	1620
ArgSerLeuAlaAspCysIleLysGlnAspIleGlyArgHisAsnCysArgHisSerGlu	540
GATGCAGGAGTTATTGTGATTATTGGCAAGAGGGCTCAGGTAAACAGTAATAAAGAG	1680
AspAlaGlyValIleCysAspTyrPheGlyLysLysAlaSerGlyAsnAsnSerLysGlu	560

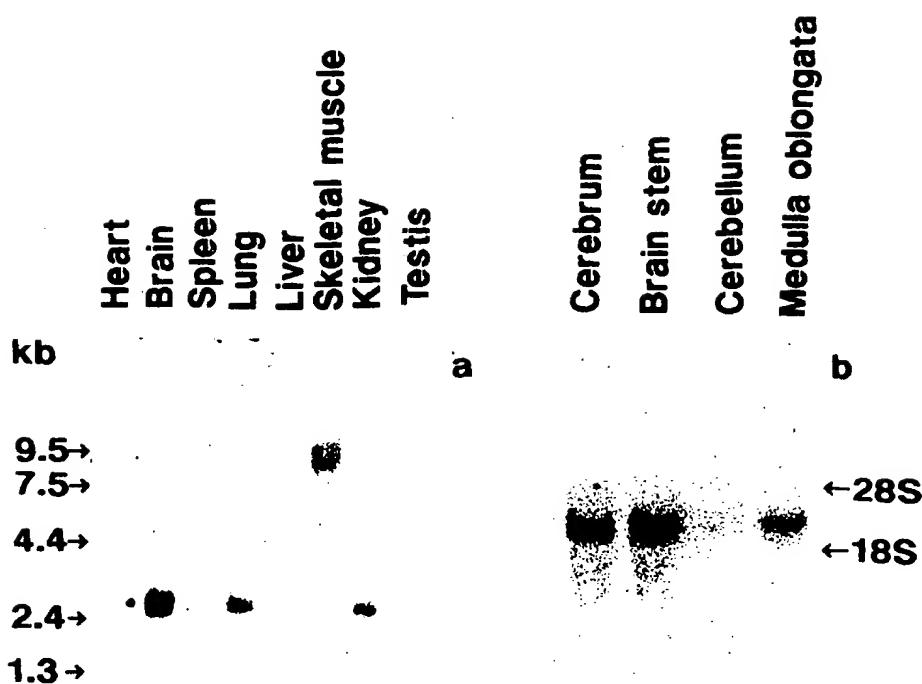
## Fig. 11

TCCCTCTCATCTGTTGGCTTGAGATTACTGCACCGTGGCAGAAGCGGATCATGGT	1740
SerLeuSerSerValCysGlyLeuArgLeuLeuHisArgArgGlnLysArgTleIleGly	580
GGGAAATTCTTAAGGGGTGGTTGGCCTTGCGAGGTTCCCTCCGGCTGAAGTCATCC	1800
GlyLysAsnSerLeuArgGlyGlyTrpProTrpGlnValSerLeuArgLeuLysSerSer	600
CATGGAGATGGCAGGCTCCTCTGGGGCTACGGCTCCTGAGTAGCTGGTCTCACA	1860
HisGlyAspGlyArgLeuLeuCysGlyAlaThrLeuSerSerCysTrpValLeuThr	620
GCAGGCACACTGTTCAAGAGGTATGGCAAACAGGCACTAGGAGCTATGCTGTTAGGGTTGGA	1920
AlaAlaHisCysPheLysArgTyrGlyAsnSerThrArgSerTyrAlaValArgValGly	640
GATTATCATACTCTGGTACCAAGGGAGTTGAGGAAGAAATTGGAGTTAACAGATTTG	1980
AspTyrHisThrLeuValProGluGluGluIleGlyValGlnGlnIleVal	660
ATTCATGGGAGTATCGACCCGACCGCAGTGATTATGACATAGCCCTGTTAGATTACAA	2040
IleHisArgGluTyrArgProAspArgSerAspTyrAspIleAlaLeuValArgLeuGln	680
GGACCAGAAGGCAATGTGCCAGATTAGCAGCCATGTTGCCCCCTGTTACCACTC	2100
GlyProGluGluGlnCysAlaArgPheSerHisValLeuProAlaCysLeuProLeu	700

## Fig. 12

TGGAGAGAGGCCACAGAACACAGCATCCAACTGTTACATAACAGGATGGGTGACACA	2160
TrpArgGluArgProGlnLysThrAlaSerAsnCysTyrIleThrGlyTrpGlyAspThr	720
GGACCGAGCCTATTCAAGAACACTACAACAAAGCAGCCATTCCCTTACTTCCTAAAGGTT	2220
GlyArgAlaTyrSerArgThrLeuGlnGlnAlaAlaIleProLeuProLysArgPhe	740
TGTGAAGAACGTTATAAGGGTCCGGTTACAGGGAGAATGCTTTGTGCTGGAAACCTCCAT	2280
CysGluGluArgTyrLysGlyArgPheThrGlyArgMetLeuCysAlaGlyAsnLeuHis	760
GAACACAAACGGGTGGACAGACTGCCAGGGAGACAGCGGAGCCACTCATGTGTGAACGG	2340
GluHisLysArgValAspSerCysGlnGlyAspSerGlyGlyProLeuMetCysGluArg	780
CCCGGAGAGCTGGGTGTTATGGGTGACCTCCTGGGGTATGGCTGTGGAGTCACAG	2400
ProGlyGluSerTrpValValTyrGlyValThrSerTrpGlyTyrGlyCysGlyValLys	800
GATTCTCCTGGTGTATAACCAAAGTCTCAGCCTTGTACCTTGGATAAAAGTGTCAAC	2460
AspSerProGlyValTyrThrLysValSerAlaPheValProTrpIleLysSerValThr	820
AAACTGTAAATTCTCATGGAAACTTCAAAAGCAGCATTAAACAAATGGAAAAACTTTGAAC	2520
LysLeu * * *	822
CCCCCACTATTAGCACTCAGCAGAGATGACAACAAACGGCAAG	2562

Fig.13



## 配 列 表

## SEQUENCE LISTING

&lt; 1 1 0 &gt; Suntory Limited

&lt; 1 2 0 &gt; Novel Serine Protease

&lt; 1 3 0 &gt; STY-F867 / PCT

&lt; 1 4 0 &gt;

&lt; 1 4 1 &gt;

&lt; 1 5 0 &gt;

&lt; 1 5 1 &gt; 1997-07-24

&lt; 1 6 0 &gt; 6

&lt; 2 1 0 &gt; 1

&lt; 2 1 1 &gt; 20

&lt; 2 1 2 &gt; DNA

&lt; 2 1 3 &gt; Artificial Sequence

&lt; 2 2 0 &gt;

&lt; 2 2 3 &gt; Synthetic DNA

&lt; 4 0 0 &gt; 1

GTGCTCACNG CNGCBCAYTG

&lt; 2 1 0 &gt; 2

&lt; 2 1 1 &gt; 20

&lt; 2 1 2 &gt; DNA

&lt; 2 1 3 &gt; Artificial Sequence

&lt; 2 2 0 &gt;

&lt; 2 2 3 &gt; Synthetic DNA

&lt; 4 0 0 &gt; 2

AGCGGNCCNC CDGARTCVCC

&lt; 2 1 0 &gt; 3

.. &lt; 2 1 1 &gt; 2614

&lt; 2 1 2 &gt; DNA

&lt; 2 1 3 &gt; Mouse

&lt; 2 2 0 &gt;

&lt; 2 2 3 &gt;

&lt; 4 0 0 &gt; 3

cgagggtggg gtggagggtcg gactccgggc tacagagctc ctggcgctca tcgcctctgg 60  
 ctccagcctt tgcttcgcgg ggctgaccct ttgggtcccg gtgtgatcct ccagctgccc 120  
 cggggctgg gacagcaggg cggcggcgcg agcgtggag ggggctctag gactctgccc 180  
 gccccgcccc gccccctccg cggggacccg gagcccagca tggaccacac tcggcgccgc 240  
 agcc atg gcg ctc gcc cgc tgc gtg ctg gct gtg att tta ggg gca ctg 289

Met Ala Leu Ala Arg Cys Val Leu Ala Val Ile Leu Gly Ala Leu

1 5 10 15

tct gta gtg gcc cgc gct gat ccg gtc tcg cgc tct ccc ctt cac cgc 337

Ser Val Val Ala Arg Ala Asp Pro Val Ser Arg Ser Pro Leu His Arg

20 25 30

ccg cat ccg tcc cca ccg cgt tcc caa cac gcg cac tac ctt ccc agc 385

Pro His Pro Ser Pro Pro Arg Ser Gln His Ala His Tyr Leu Pro Ser

35 40 45

tcg cgg cgg cca ccc agg acc ccg cgc ttc ccg ctc ccg ctg cgg atc 433

Ser Arg Arg Pro Pro Arg Thr Pro Arg Phe Pro Leu Pro Leu Arg Ile

50 55 60

ccc gct gcc cag cgc ccg cag gtc ctc agc acc ggg cac acg ccc ccg 481

Pro Ala Ala Gln Arg Pro Gln Val Leu Ser Thr Gly His Thr Pro Pro

65 70 75

acg att cca cgc cgc tgc ggg gca gga gag tcg tgg ggc aat gcc acc 529  
 Thr Ile Pro Arg Arg Cys Gly Ala Gly Glu Ser Trp Gly Asn Ala Thr  
 80 85 90 95  
 aac ctc ggc gtc ccg tgt cta cac tgg gac gag gtg ccg ccc ttc ctg 577  
 Asn Leu Gly Val Pro Cys Leu His Trp Asp Glu Val Pro Pro Phe Leu  
 100 105 110  
 gag cgg tcg ccc ccg gcc agt tgg gct gag ctg cga ggg cag ccg cac 625  
 Glu Arg Ser Pro Pro Ala Ser Trp Ala Glu Leu Arg Gly Gln Pro His  
 115 120 125  
 aac ttc tgc cgg agc ccg gat ggc tcg ggc aga cct tgg tgc ttc tat 673  
 Asn Phe Cys Arg Ser Pro Asp Gly Ser Gly Arg Pro Trp Cys Phe Tyr  
 130 135 140  
 cgg aat gcc cag ggc aaa gta gac tgg ggc tac tgc gat tgt ggt caa 721  
 Arg Asn Ala Gln Gly Lys Val Asp Trp Gly Tyr Cys Asp Cys Gly Gln  
 145 150 155  
 ggc ccg gcg ttg ccc gtc att cgc ctt gtt ggt ggg aac agt ggg cat 769  
 Gly Pro Ala Leu Pro Val Ile Arg Leu Val Gly Gly Asn Ser Gly His  
 160 165 170 175  
 gaa ggt cga gtg gag ctg tac cac gct ggc cag tgg ggg acc atc tgt 817  
 Glu Gly Arg Val Glu Leu Tyr His Ala Gly Gln Trp Gly Thr Ile Cys  
 180 185 190  
 gac gac caa tgg gac aat gca gac gca gac gtc atc tgt agg cag ctg 865  
 Asp Asp Gln Trp Asp Asn Ala Asp Ala Asp Val Ile Cys Arg Gln Leu  
 195 200 205  
 ggg ctc agt ggc att gcc aaa gca tgg cat cag gca cat ttt ggg gaa 913  
 Gly Leu Ser Gly Ile Ala Lys Ala Trp His Gln Ala His Phe Gly Glu  
 210 215 220

...gga tct ggc cca ata ttg ttg gat gaa gta cgc tgc acc gga aac gag 961  
 Gly Ser Gly Pro Ile Leu Leu Asp Glu Val Arg Cys Thr Gly Asn Glu  
 225 230 235  
 ctg tca att gag caa tgt cca aag agt tcc tgg ggc gaa cat aac tgt 1009  
 Leu Ser Ile Glu Gln Cys Pro Lys Ser Ser Trp Gly Glu His Asn Cys  
 240 245 250 255  
 ggc cat aaa gaa gat gct gga gtg tct tgt gtt cct cta aca gat ggt 1057  
 Gly His Lys Glu Asp Ala Gly Val Ser Cys Val Pro Leu Thr Asp Gly  
 260 265 270  
 gtc atc aga ctg gca gga gga aaa agt acc cat gaa ggt cgc ctg gag 1105  
 Val Ile Arg Leu Ala Gly Gly Lys Ser Thr His Glu Gly Arg Leu Glu  
 275 280 285  
 gtc tac tac aag ggg cag tgg ggg aca gtc tgt gat gat ggc tgg act 1153  
 Val Tyr Tyr Lys Gly Gln Trp Gly Thr Val Cys Asp Asp Gly Trp Thr  
 290 295 300  
 gag atg aac aca tac gtg gct tgt cga ctg ctg gga ttt aaa tac ggc 1201  
 Glu Met Asn Thr Tyr Val Ala Cys Arg Leu Leu Gly Phe Lys Tyr Gly  
 305 310 315  
 aaa cag tcc tct gtg aac cat ttt gat ggc agc aac agg ccc ata tgg 1249  
 Lys Gln Ser Ser Val Asn His Phe Asp Gly Ser Asn Arg Pro Ile Trp  
 320 325 330 335  
 ctg gat gac gtc agc tgc tca gga aaa gaa gtc agc ttc att cag tgt 1297  
 Leu Asp Asp Val Ser Cys Ser Gly Lys Glu Val Ser Phe Ile Gln Cys  
 340 345 350  
 tcc agg aga cag tgg gga agg cat gac tgc agc cat aga gaa gat gtg 1345  
 Ser Arg Arg Gln Trp Gly Arg His Asp Cys Ser His Arg Glu Asp Val  
 355 360 365

ggc ctc acc tgc tat cct gac agc gat gga cat agg ctt tct cca ggt 1393  
 Gly Leu Thr Cys Tyr Pro Asp Ser Asp Gly His Arg Leu Ser Pro Gly  
 370 375 380  
 ttt ccc atc aga cta gtg gat gga gag aat aag aag gaa gga cga gtg 1441  
 Phe Pro Ile Arg Leu Val Asp Gly Glu Asn Lys Lys Glu Gly Arg Val  
 385 390 395  
 gag gtt ttt gtc aat ggc caa tgg gga aca atc tgc gat gac gga tgg 1489  
 Glu Val Phe Val Asn Gly Gln Trp Gly Thr Ile Cys Asp Asp Gly Trp  
 400 405 410 415  
 acc gat aag cat gca gct gtg atc tgc cgg cag ctt ggc tat aag ggt 1537  
 Thr Asp Lys His Ala Ala Val Ile Cys Arg Gln Leu Gly Tyr Lys Gly  
 420 425 430  
 cct gcc aga gca agg act atg gct tat ttt ggg gaa gga aaa ggc ccc 1585  
 Pro Ala Arg Ala Arg Thr Met Ala Tyr Phe Gly Glu Gly Lys Gly Pro  
 435 440 445  
 atc cac atg gat aat gtg aag tgc aca gga aat gag aag gcc ctg gct 1633  
 Ile His Met Asp Asn Val Lys Cys Thr Gly Asn Glu Lys Ala Leu Ala  
 450 455 460  
 gac tgt gtc aaa caa gac att gga agg cac aac tgc cgc cac agt gag 1681  
 Asp Cys Val Lys Gln Asp Ile Gly Arg His Asn Cys Arg His Ser Glu  
 465 470 475  
 gat gca gga gtc atc tgt gac tat tta gag aag aaa gca tca agt agt 1729  
 Asp Ala Gly Val Ile Cys Asp Tyr Leu Glu Lys Lys Ala Ser Ser Ser  
 480 485 490 495  
 ggt aat aaa gag atg ctc tca tct gga tgt gga ctg agg tta ctg cac 1777  
 Gly Asn Lys Glu Met Leu Ser Ser Gly Cys Gly Leu Arg Leu Leu His  
 500 505 510

cgt cgg cag aaa cgg atc att ggt ggg aac aat tct tta agg ggt gcc 1825  
 Arg Arg Gln Lys Arg Ile Ile Gly Gly Asn Asn Ser Leu Arg Gly Ala  
 515 520 525  
 tgg cct tgg cag gct tcc ctc agg ctg agg tcg gcc cat gga gac ggc 1873  
 Trp Pro Trp Gln Ala Ser Leu Arg Leu Arg Ser Ala His Gly Asp Gly  
 530 535 540  
 agg ctg ctt tgt gga gct acc ctt ctg agt agc tgc tgg gtc ctg aca 1921  
 Arg Leu Leu Cys Gly Ala Thr Leu Leu Ser Ser Cys Trp Val Leu Thr  
 545 550 555  
 gct gca cac tgc ttc aaa agg tac gga aac aac tcg agg agc tat gca 1969  
 Ala Ala His Cys Phe Lys Arg Tyr Gly Asn Asn Ser Arg Ser Tyr Ala  
 560 565 570 575  
 gtt cga gtt ggg gat tat cat act ctg gta cca gag gag ttt gaa caa 2017  
 Val Arg Val Gly Asp Tyr His Thr Leu Val Pro Glu Glu Phe Glu Gln  
 580 585 590  
 gaa ata ggg gtt caa cag att gtg att cac agg aac tac agg cca gac 2065  
 Glu Ile Gly Val Gln Gln Ile Val Ile His Arg Asn Tyr Arg Pro Asp  
 595 600 605  
 aga agc gac tat gac att gcc ctg gtt aga ttg caa gga cca ggg gag 2113  
 Arg Ser Asp Tyr Asp Ile Ala Leu Val Arg Leu Gln Gly Pro Gly Glu  
 610 615 620  
 caa tgt gcc aga cta agc acc cac gtt ttg cca gcc tgt tta cct cta 2161  
 Gln Cys Ala Arg Leu Ser Thr His Val Leu Pro Ala Cys Leu Pro Ile  
 625 630 635  
 tgg aga gag agg cca cag aaa aca gcc tcc aac tgt cac ata aca gga 2209  
 Trp Arg Glu Arg Pro Gln Lys Thr Ala Ser Asn Cys His Ile Thr Gly  
 640 645 650 655

tgg gga gac aca ggt cgt gcc tac tca aga act cta caa caa gct gct 2257  
 Trp Gly Asp Thr Gly Arg Ala Tyr Ser Arg Thr Leu Gln Gln Ala Ala  
 660 665 670  
 gtg cct ctg tta ccc aag agg ttt tgt aaa gag agg tac aag gga cta 2305  
 Val Pro Leu Leu Pro Lys Arg Phe Cys Lys Glu Arg Tyr Lys Gly Leu  
 675 680 685  
 ttt act ggg aga atg ctc tgt gct ggg aac ctc caa gaa gac aac cgt 2353  
 Phe Thr Gly Arg Met Leu Cys Ala Gly Asn Leu Gln Glu Asp Asn Arg  
 690 695 700  
 gtg gac agc tgc cag gga gac agt gga gga cca ctc atg tgt gaa aag 2401  
 Val Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro Leu Met Cys Glu Lys  
 705 710 715  
 cct gat gag tcc tgg gtt gtg tat ggg gtg act tcc tgg ggg tat gga 2449  
 Pro Asp Glu Ser Trp Val Val Tyr Gly Val Thr Ser Trp Gly Tyr Gly  
 720 725 730 735  
 tgt gga gtc aaa gac act cct gga gtt tat acc aga gtc ccc gcc ttt 2497  
 Cys Gly Val Lys Asp Thr Pro Gly Val Tyr Thr Arg Val Pro Ala Phe  
 740 745 750  
 gta cct tgg ata aaa agt gtc acc agt ctg taacttatgg aaagctcaag 2547  
 Val Pro Trp Ile Lys Ser Val Thr Ser Leu  
 755 760  
 aaaatagtaa aacagtaacc attcagtcatt catactggc accatgccag aaaaaaaaaa 2607  
 aaaaaaaaaa 2614  
 < 2 1 0 > 4  
 < 2 1 1 > 761  
 < 2 1 2 > PRT  
 < 2 1 3 > Mouse

&lt; 2 2 0 &gt;

&lt; 2 2 3 &gt;

&lt; 4 0 0 &gt; 4

Met Ala Leu Ala Arg Cys Val Leu Ala Val Ile Leu Gly Ala Leu Ser  
1 5 10 15  
Val Val Ala Arg Ala Asp Pro Val Ser Arg Ser Pro Leu His Arg Pro  
20 25 30  
His Pro Ser Pro Pro Arg Ser Gln His Ala His Tyr Leu Pro Ser Ser  
35 40 45  
Arg Arg Pro Pro Arg Thr Pro Arg Phe Pro Leu Pro Leu Arg Ile Pro  
50 55 60  
Ala Ala Gln Arg Pro Gln Val Leu Ser Thr Gly His Thr Pro Pro Thr  
65 70 75 80  
Ile Pro Arg Arg Cys Gly Ala Gly Glu Ser Trp Gly Asn Ala Thr Asn  
85 90 95  
Leu Gly Val Pro Cys Leu His Trp Asp Glu Val Pro Pro Phe Leu Glu  
100 105 110  
Arg Ser Pro Pro Ala Ser Trp Ala Glu Leu Arg Gly Gln Pro His Asn  
115 120 125  
Phe Cys Arg Ser Pro Asp Gly Ser Gly Arg Pro Trp Cys Phe Tyr Arg  
130 135 140  
Asn Ala Gln Gly Lys Val Asp Trp Gly Tyr Cys Asp Cys Gly Gln Gly  
145 150 155 160  
Pro Ala Leu Pro Val Ile Arg Leu Val Gly Gly Asn Ser Gly His Glu  
165 170 175  
Gly Arg Val Glu Leu Tyr His Ala Gly Gln Trp Gly Thr Ile Cys Asp  
180 185 190

Asp Gln Trp Asp Asn Ala Asp Ala Asp Val Ile Cys Arg Gln Leu Gly  
195 200 205  
Leu Ser Gly Ile Ala Lys Ala Trp His Gln Ala His Phe Gly Glu Gly  
210 215 220  
Ser Gly Pro Ile Leu Leu Asp Glu Val Arg Cys Thr Gly Asn Glu Leu  
225 230 235 240  
Ser Ile Glu Gln Cys Pro Lys Ser Ser Trp Gly Glu His Asn Cys Gly  
245 250 255  
His Lys Glu Asp Ala Gly Val Ser Cys Val Pro Leu Thr Asp Gly Val  
260 265 270  
Ile Arg Leu Ala Gly Gly Lys Ser Thr His Glu Gly Arg Leu Glu Val  
275 280 285  
Tyr Tyr Lys Gly Gln Trp Gly Thr Val Cys Asp Asp Gly Trp Thr Glu  
290 295 300  
Met Asn Thr Tyr Val Ala Cys Arg Leu Leu Gly Phe Lys Tyr Gly Lys  
305 310 315 320  
Gln Ser Ser Val Asn His Phe Asp Gly Ser Asn Arg Pro Ile Trp Leu  
325 330 335  
Asp Asp Val Ser Cys Ser Gly Lys Glu Val Ser Phe Ile Gln Cys Ser  
340 345 350  
Arg Arg Gln Trp Gly Arg His Asp Cys Ser His Arg Glu Asp Val Gly  
355 360 365  
Leu Thr Cys Tyr Pro Asp Ser Asp Gly His Arg Leu Ser Pro Gly Phe  
370 375 380  
Pro Ile Arg Leu Val Asp Gly Glu Asn Lys Lys Glu Gly Arg Val Glu  
385 390 395 400

Val Phe Val Asn Gly Gln Trp Gly Thr Ile Cys Asp Asp Gly Trp Thr  
405 410 415  
Asp Lys His Ala Ala Val Ile Cys Arg Gln Leu Gly Tyr Lys Gly Pro  
420 425 430  
Ala Arg Ala Arg Thr Met Ala Tyr Phe Gly Glu Gly Lys Gly Pro Ile  
435 440 445  
His Met Asp Asn Val Lys Cys Thr Gly Asn Glu Lys Ala Leu Ala Asp  
450 455 460  
Cys Val Lys Gln Asp Ile Gly Arg His Asn Cys Arg His Ser Glu Asp  
465 470 475 480  
Ala Gly Val Ile Cys Asp Tyr Leu Glu Lys Lys Ala Ser Ser Ser Gly  
485 490 495  
Asn Lys Glu Met Leu Ser Ser Gly Cys Gly Leu Arg Leu Leu His Arg  
500 505 510  
Arg Gln Lys Arg Ile Ile Gly Gly Asn Asn Ser Leu Arg Gly Ala Trp  
515 520 525  
Pro Trp Gln Ala Ser Leu Arg Leu Arg Ser Ala His Gly Asp Gly Arg  
530 535 540  
Leu Leu Cys Gly Ala Thr Leu Leu Ser Ser Cys Trp Val Leu Thr Ala  
545 550 555 560  
Ala His Cys Phe Lys Arg Tyr Gly Asn Asn Ser Arg Ser Tyr Ala Val  
565 570 575  
Arg Val Gly Asp Tyr His Thr Leu Val Pro Glu Glu Phe Glu Gln Glu  
580 585 590  
Ile Gly Val Gln Gln Ile Val Ile His Arg Asn Tyr Arg Pro Asp Arg  
595 600 605

.. Ser Asp Tyr Asp Ile Ala Leu Val Arg Leu Gln Gly Pro Gly Glu Gln  
610 615 620  
Cys Ala Arg Leu Ser Thr His Val Leu Pro Ala Cys Leu Pro Ile Trp  
625 630 635 640  
Arg Glu Arg Pro Gln Lys Thr Ala Ser Asn Cys His Ile Thr Gly Trp  
645 650 655  
Gly Asp Thr Gly Arg Ala Tyr Ser Arg Thr Leu Gln Gln Ala Ala Val  
660 665 670  
Pro Leu Leu Pro Lys Arg Phe Cys Lys Glu Arg Tyr Lys Gly Leu Phe  
675 680 685  
Thr Gly Arg Met Leu Cys Ala Gly Asn Leu Gln Glu Asp Asn Arg Val  
690 695 700  
Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro Leu Met Cys Glu Lys Pro  
705 710 715 720  
Asp Glu Ser Trp Val Val Tyr Gly Val Thr Ser Trp Gly Tyr Gly Cys  
725 730 735  
Gly Val Lys Asp Thr Pro Gly Val Tyr Thr Arg Val Pro Ala Phe Val  
740 745 750  
Pro Trp Ile Lys Ser Val Thr Ser Leu  
755 760  
< 2 1 0 > 5  
< 2 1 1 > 2562  
< 2 1 2 > DNA  
< 2 1 3 > Human  
< 2 2 0 >  
< 2 2 3 >  
< 4 0 0 > 5

ccg acg acg cgt ccg ccg cct ctc ccg cgc ttc ccg cgc ccc ccg 48  
 Pro Thr Thr Arg Pro Pro Pro Pro Leu Pro Arg Phe Pro Arg Pro Pro  
 1 5 10 15  
 cg<sup>g</sup> g<sup>c</sup> c<sup>t</sup> c<sup>c</sup> g<sup>c</sup> c<sup>c</sup> a<sup>g</sup> c<sup>g</sup> c<sup>c</sup> a<sup>c</sup> g<sup>c</sup> c<sup>t</sup> c<sup>a</sup> g<sup>a</sup> g<sup>g</sup> c<sup>a</sup> c<sup>a</sup> acg 96  
 Arg Ala Leu Pro Ala Gln Arg Pro His Ala Leu Gln Ala Gly His Thr  
 20 25 30  
 c<sup>cc</sup> c<sup>gg</sup> c<sup>cg</sup> c<sup>ac</sup> c<sup>cc</sup> t<sup>gg</sup> g<sup>gc</sup> t<sup>gc</sup> c<sup>cc</sup> g<sup>cc</sup> g<sup>gc</sup> g<sup>a</sup> g<sup>ca</sup> t<sup>gg</sup> g<sup>tc</sup> a<sup>gc</sup> 144  
 Pro Arg Pro His Pro Trp Gly Cys Pro Ala Gly Glu Pro Trp Val Ser  
 35 40 45  
 g<sup>tg</sup> a<sup>cg</sup> g<sup>ac</sup> t<sup>tc</sup> g<sup>gc</sup> g<sup>cc</sup> c<sup>cg</sup> t<sup>gt</sup> c<sup>tg</sup> c<sup>gg</sup> t<sup>gg</sup> g<sup>cg</sup> g<sup>a</sup> g<sup>tg</sup> c<sup>ca</sup> c<sup>cc</sup> 192  
 Val Thr Asp Phe Gly Ala Pro Cys Leu Arg Trp Ala Glu Val Pro Pro  
 50 55 60  
 t<sup>tc</sup> c<sup>tg</sup> g<sup>ag</sup> c<sup>gg</sup> t<sup>cg</sup> c<sup>cc</sup> c<sup>ca</sup> g<sup>cg</sup> a<sup>gc</sup> t<sup>gg</sup> g<sup>ct</sup> c<sup>ag</sup> c<sup>tg</sup> c<sup>ga</sup> g<sup>ga</sup> c<sup>ag</sup> 240  
 Phe Leu Glu Arg Ser Pro Pro Ala Ser Trp Ala Gln Leu Arg Gly Gln  
 65 70 75 80  
 c<sup>gc</sup> c<sup>ac</sup> a<sup>ac</sup> t<sup>tt</sup> t<sup>gt</sup> c<sup>gg</sup> a<sup>gc</sup> c<sup>cc</sup> g<sup>ac</sup> g<sup>gc</sup> g<sup>cg</sup> g<sup>gc</sup> a<sup>ga</sup> c<sup>cc</sup> t<sup>gg</sup> t<sup>gt</sup> 288  
 Arg His Asn Phe Cys Arg Ser Pro Asp Gly Ala Gly Arg Pro Trp Cys  
 85 90 95  
 t<sup>tc</sup> t<sup>ac</sup> g<sup>ga</sup> g<sup>ac</sup> g<sup>cc</sup> c<sup>gt</sup> g<sup>gc</sup> a<sup>ag</sup> g<sup>tg</sup> g<sup>ac</sup> t<sup>gg</sup> g<sup>gc</sup> t<sup>ac</sup> t<sup>gc</sup> g<sup>ac</sup> t<sup>gc</sup> 336  
 Phe Tyr Gly Asp Ala Arg Gly Lys Val Asp Trp Gly Tyr Cys Asp Cys  
 100 105 110  
 a<sup>ga</sup> c<sup>ac</sup> g<sup>ga</sup> t<sup>ca</sup> g<sup>ta</sup> c<sup>ga</sup> c<sup>tt</sup> c<sup>gt</sup> g<sup>gc</sup> g<sup>gc</sup> a<sup>aa</sup> a<sup>at</sup> g<sup>ag</sup> t<sup>tt</sup> g<sup>aa</sup> g<sup>gc</sup> 384  
 Arg His Gly Ser Val Arg Leu Arg Gly Gly Lys Asn Glu Phe Glu Gly  
 115 120 125  
 a<sup>ca</sup> g<sup>tg</sup> g<sup>aa</sup> g<sup>ta</sup> t<sup>at</sup> g<sup>ca</sup> a<sup>gt</sup> g<sup>ga</sup> g<sup>tt</sup> t<sup>gg</sup> g<sup>gc</sup> a<sup>ct</sup> g<sup>tc</sup> t<sup>gt</sup> a<sup>gc</sup> a<sup>gc</sup> 432  
 Thr Val Glu Val Tyr Ala Ser Gly Val Trp Gly Thr Val Cys Ser Ser  
 130 135 140

cac tgg gat gat tct gat gca tca gtc att tgt cac cag ctg cag ctg 480  
 His Trp Asp Asp Ser Asp Ala Ser Val Ile Cys His Gln Leu Gln Leu  
 145 150 155 160  
 gga gga aaa gga ata gca aaa caa acc ccg ttt tct gga ctg ggc ctt 528  
 Gly Gly Lys Gly Ile Ala Lys Gln Thr Pro Phe Ser Gly Leu Gly Leu  
 165 170 175  
 att ccc att tat tgg agc aat gtc cgt tgc cga gga gat gaa gaa aat 576  
 Ile Pro Ile Tyr Trp Ser Asn Val Arg Cys Arg Gly Asp Glu Glu Asn  
 180 185 190  
 ata ctg ctt tgt gaa aaa gac atc tgg cag ggt ggg gtg tgt cct cag 624  
 Ile Leu Leu Cys Glu Lys Asp Ile Trp Gln Gly Gly Val Cys Pro Gln  
 195 200 205  
 aag atg gca gct gct gtc acg tgt agc ttt tcc cat ggc cca acg ttc 672  
 Lys Met Ala Ala Ala Val Thr Cys Ser Phe Ser His Gly Pro Thr Phe  
 210 215 220  
 ccc atc att cgc ctt gct gga ggc agc agt gtg cat gaa ggc cgg gtg 720  
 Pro Ile Ile Arg Leu Ala Gly Gly Ser Ser Val His Glu Gly Arg Val  
 225 230 235 240  
 gag ctc tac cat gct ggc cag tgg gga acc gtt tgt gat gac caa tgg 768  
 Glu Leu Tyr His Ala Gly Gln Trp Gly Thr Val Cys Asp Asp Gln Trp  
 245 250 255  
 gat gat gcc gat gca gaa gtg atc tgc agg cag ctg ggc ctc agt ggc 816  
 Asp Asp Ala Asp Ala Glu Val Ile Cys Arg Gln Leu Gly Leu Ser Gly  
 260 265 270  
 att gcc aaa gca tgg cat cag gca tat ttt ggg gaa ggg tct ggc cca 864  
 Ile Ala Lys Ala Trp His Gln Ala Tyr Phe Gly Glu Gly Ser Gly Pro  
 275 280 285

gtt atg ttg gat gaa gta cgc tgc act ggg aat gag ctt tca att gag 912  
 Val Met Leu Asp Glu Val Arg Cys Thr Gly Asn Glu Leu Ser Ile Glu  
 290 295 300  
 cag tgt cca aag agc tcc tgg gga gag cat aac tgt ggc cat aaa gaa 960  
 Gln Cys Pro Lys Ser Ser Trp Gly Glu His Asn Cys Gly His Lys Glu  
 305 310 315 320  
 gat gct gga gtg tcc tgt acc cct cta aca gat ggg gtc atc aga ctt 1008  
 Asp Ala Gly Val Ser Cys Thr Pro Leu Thr Asp Gly Val Ile Arg Leu  
 325 330 335  
 gca ggt ggg aaa ggc agc cat gag ggt cgc ttg gag gta tat tac aga 1056  
 Ala Gly Gly Lys Gly Ser His Glu Gly Arg Leu Glu Val Tyr Tyr Arg  
 340 345 350  
 ggc cag tgg gga act gtc tgt gat gat ggc tgg act gag ctg aat aca 1104  
 Gly Gln Trp Gly Thr Val Cys Asp Asp Gly Trp Thr Glu Leu Asn Thr  
 355 360 365  
 tac gtg gtt tgt cga cag ttg gga ttt aaa tat ggt aaa caa gca tct 1152  
 Tyr Val Val Cys Arg Gln Leu Gly Phe Lys Tyr Gly Lys Gln Ala Ser  
 370 375 380  
 gcc aac cat ttt gaa gaa agc aca ggg ccc ata tgg ttg gat gac gtc 1200  
 Ala Asn His Phe Glu Glu Ser Thr Gly Pro Ile Trp Leu Asp Asp Val  
 385 390 395 400  
 agc tgc tca gga aag gaa acc aga ttt ctt cag tgt tcc agg cga cag 1248  
 Ser Cys Ser Gly Lys Glu Thr Arg Phe Leu Gln Cys Ser Arg Arg Gln  
 405 410 415  
 tgg gga agg cat gac tgc agc cac cgc gaa gat gtt agc att gcc tgc 1296  
 Trp Gly Arg His Asp Cys Ser His Arg Glu Asp Val Ser Ile Ala Cys  
 420 425 430

tac cct ggc ggc gag gga cac agg ctc tct ctg ggt ttt cct gtc aga 1344  
 Tyr Pro Gly Gly Glu Gly His Arg Leu Ser Leu Gly Phe Pro Val Arg  
 435 440 445  
 ctg atg gat gga gaa aat aag aaa gaa gga cga gtg gag gtt ttt atc 1392  
 Leu Met Asp Gly Glu Asn Lys Lys Glu Gly Arg Val Glu Val Phe Ile  
 450 455 460  
 aat ggc cag tgg gga aca atc tgt gat gat gga tgg act gat aag gat 1440  
 Asn Gly Gln Trp Gly Thr Ile Cys Asp Asp Gly Trp Thr Asp Lys Asp  
 465 470 475 480  
 gca gct gtg atc tgt cgt cag ctt ggc tac aag ggt cct gcc aga gca 1488  
 Ala Ala Val Ile Cys Arg Gln Leu Gly Tyr Lys Gly Pro Ala Arg Ala  
 485 490 495  
 aga acc atg gct tac ttt gga gaa gga aaa gga ccc atc cat gtg gat 1536  
 Arg Thr Met Ala Tyr Phe Gly Glu Gly Lys Gly Pro Ile His Val Asp  
 500 505 510  
 aat gtg aag tgc aca gga aat gag agg tcc ttg gct gac tgt atc aag 1584  
 Asn Val Lys Cys Thr Gly Asn Glu Arg Ser Leu Ala Asp Cys Ile Lys  
 515 520 525  
 caa gat att gga aga cac aac tgc cgc cac agt gaa gat gca gga gtt 1632  
 Gln Asp Ile Gly Arg His Asn Cys Arg His Ser Glu Asp Ala Gly Val  
 530 535 540  
 att tgt gat tat ttt ggc aag aag gcc tca ggt aac agt aat aaa gag 1680  
 Ile Cys Asp Tyr Phe Gly Lys Lys Ala Ser Gly Asn Ser Asn Lys Glu  
 545 550 555 560  
 tcc ctc tca tct gtt tgt ggc ttg aga tta ctg cac cgt cgg cag aag 1728  
 Ser Leu Ser Ser Val Cys Gly Leu Arg Leu Leu His Arg Arg Gln Lys  
 565 570 575



gga cga gcc tat tca aga aca cta caa gca gcc att ccc tta ctt 2208  
 Gly Arg Ala Tyr Ser Arg Thr Leu Gln Gln Ala Ala Ile Pro Leu Leu  
 725 730 735  
 cct aaa agg ttt tgt gaa gaa cgt tat aag ggt cgg ttt aca ggg aga 2256  
 Pro Lys Arg Phe Cys Glu Glu Arg Tyr Lys Gly Arg Phe Thr Gly Arg  
 740 745 750  
 atg ctt tgt gct gga aac ctc cat gaa cac aaa cgc gtg gac agc tgc 2304  
 Met Leu Cys Ala Gly Asn Leu His Glu His Lys Arg Val Asp Ser Cys  
 755 760 765  
 cag gga gac agc gga gga cca ctc atg tgt gaa cgg ccc gga gag agc 2352  
 Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro Leu Met Cys Glu Arg Pro Gly Glu Ser  
 770 775 780  
 tgg gtg gtg tat ggg gtg acc tcc tgg ggg tat ggc tgt gga gtc aag 2400  
 Trp Val Val Tyr Gly Val Thr Ser Trp Gly Tyr Gly Cys Gly Val Lys  
 785 790 795 800  
 gat tct cct ggt gtt tat acc aaa gtc tca gcc ttt gta cct tgg ata 2448  
 Asp Ser Pro Gly Val Tyr Thr Lys Val Ser Ala Phe Val Pro Trp Ile  
 805 810 815  
 aaa agt gtc acc aaa ctg taattttca tggaaacttc aaagcagcat 2496  
 Lys Ser Val Thr Lys Leu  
 820  
 ttaaacaat ggaaaacttt gaaccccac tattagcact cagcagagat gacaacaaac 2556  
 ggcaag 2562  
 < 2 1 0 > 6  
 < 2 1 1 > 822  
 < 2 1 2 > PRT  
 < 2 1 3 > Human

&lt; 2 2 0 &gt;

&lt; 2 2 3 &gt;

&lt; 4 0 0 &gt; 6

Pro Thr Thr Arg Pro Pro Pro Pro Leu Pro Arg Phe Pro Arg Pro Pro

1 5 10 15

Arg Ala Leu Pro Ala Gln Arg Pro His Ala Leu Gln Ala Gly His Thr

20 25 30

Pro Arg Pro His Pro Trp Gly Cys Pro Ala Gly Glu Pro Trp Val Ser

35 40 45

Val Thr Asp Phe Gly Ala Pro Cys Leu Arg Trp Ala Glu Val Pro Pro

50 55 60

Phe Leu Glu Arg Ser Pro Pro Ala Ser Trp Ala Gln Leu Arg Gly Gln

65 70 75 80

Arg His Asn Phe Cys Arg Ser Pro Asp Gly Ala Gly Arg Pro Trp Cys

85 90 95

Phe Tyr Gly Asp Ala Arg Gly Lys Val Asp Trp Gly Tyr Cys Asp Cys

100 105 110

Arg His Gly Ser Val Arg Leu Arg Gly Gly Lys Asn Glu Phe Glu Gly

115 120 125

Thr Val Glu Val Tyr Ala Ser Gly Val Trp Gly Thr Val Cys Ser Ser

130 135 140

His Trp Asp Asp Ser Asp Ala Ser Val Ile Cys His Gln Leu Gln Leu

145 150 155 160

Gly Gly Lys Gly Ile Ala Lys Gln Thr Pro Phe Ser Gly Leu Gly Leu

165 170 175

Ile Pro Ile Tyr Trp Ser Asn Val Arg Cys Arg Gly Asp Glu Glu Asn

180 185 190

Ile Leu Leu Cys Glu Lys Asp Ile Trp Gln Gly Gly Val Cys Pro Gln  
195 200 205  
Lys Met Ala Ala Ala Val Thr Cys Ser Phe Ser His Gly Pro Thr Phe  
210 215 220  
Pro Ile Ile Arg Leu Ala Gly Gly Ser Ser Val His Glu Gly Arg Val  
225 230 235 240  
Glu Leu Tyr His Ala Gly Gln Trp Gly Thr Val Cys Asp Asp Gln Trp  
245 250 255  
Asp Asp Ala Asp Ala Glu Val Ile Cys Arg Gln Leu Gly Leu Ser Gly  
260 265 270  
Ile Ala Lys Ala Trp His Gln Ala Tyr Phe Gly Glu Gly Ser Gly Pro  
275 280 285  
Val Met Leu Asp Glu Val Arg Cys Thr Gly Asn Glu Leu Ser Ile Glu  
290 295 300  
Gln Cys Pro Lys Ser Ser Trp Gly Glu His Asn Cys Gly His Lys Glu  
305 310 315 320  
Asp Ala Gly Val Ser Cys Thr Pro Leu Thr Asp Gly Val Ile Arg Leu  
325 330 335  
Ala Gly Gly Lys Gly Ser His Glu Gly Arg Leu Glu Val Tyr Tyr Arg  
340 345 350  
Gly Gln Trp Gly Thr Val Cys Asp Asp Gly Trp Thr Glu Leu Asn Thr  
355 360 365  
Tyr Val Val Cys Arg Gln Leu Gly Phe Lys Tyr Gly Lys Gln Ala Ser  
370 375 380  
Ala Asn His Phe Glu Glu Ser Thr Gly Pro Ile Trp Leu Asp Asp Val  
385 390 395 400

Ser Cys Ser Gly Lys Glu Thr Arg Phe Leu Gln Cys Ser Arg Arg Gln  
405 410 415  
Trp Gly Arg His Asp Cys Ser His Arg Glu Asp Val Ser Ile Ala Cys  
420 425 430  
Tyr Pro Gly Gly Glu Gly His Arg Leu Ser Leu Gly Phe Pro Val Arg  
435 440 445  
Leu Met Asp Gly Glu Asn Lys Lys Glu Gly Arg Val Glu Val Phe Ile  
450 455 460  
Asn Gly Gln Trp Gly Thr Ile Cys Asp Asp Gly Trp Thr Asp Lys Asp  
465 470 475 480  
Ala Ala Val Ile Cys Arg Gln Leu Gly Tyr Lys Gly Pro Ala Arg Ala  
485 490 495  
Arg Thr Met Ala Tyr Phe Gly Glu Gly Lys Gly Pro Ile His Val Asp  
500 505 510  
Asn Val Lys Cys Thr Gly Asn Glu Arg Ser Leu Ala Asp Cys Ile Lys  
515 520 525  
Gln Asp Ile Gly Arg His Asn Cys Arg His Ser Glu Asp Ala Gly Val  
530 535 540  
Ile Cys Asp Tyr Phe Gly Lys Lys Ala Ser Gly Asn Ser Asn Lys Glu  
545 550 555 560  
Ser Leu Ser Ser Val Cys Gly Leu Arg Leu Leu His Arg Arg Gln Lys  
565 570 575  
Arg Ile Ile Gly Gly Lys Asn Ser Leu Arg Gly Gly Trp Pro Trp Gln  
580 585 590  
Val Ser Leu Arg Leu Lys Ser Ser His Gly Asp Gly Arg Leu Leu Cys  
595 600 605

Gly Ala Thr Leu Leu Ser Ser Cys Trp Val Leu Thr Ala Ala His Cys  
610 615 620  
Phe Lys Arg Tyr Gly Asn Ser Thr Arg Ser Tyr Ala Val Arg Val Gly  
625 630 635 640  
Asp Tyr His Thr Leu Val Pro Glu Glu Phe Glu Glu Glu Ile Gly Val  
645 650 655  
Gln Gln Ile Val Ile His Arg Glu Tyr Arg Pro Asp Arg Ser Asp Tyr  
660 665 670  
Asp Ile Ala Leu Val Arg Leu Gln Gly Pro Glu Glu Gln Cys Ala Arg  
675 680 685  
Phe Ser Ser His Val Leu Pro Ala Cys Leu Pro Leu Trp Arg Glu Arg  
690 695 700  
Pro Gln Lys Thr Ala Ser Asn Cys Tyr Ile Thr Gly Trp Gly Asp Thr  
705 710 715 720  
Gly Arg Ala Tyr Ser Arg Thr Leu Gln Gln Ala Ala Ile Pro Leu Leu  
725 730 735  
Pro Lys Arg Phe Cys Glu Glu Arg Tyr Lys Gly Arg Phe Thr Gly Arg  
740 745 750  
Met Leu Cys Ala Gly Asn Leu His Glu His Lys Arg Val Asp Ser Cys  
755 760 765  
Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro Leu Met Cys Glu Arg Pro Gly Glu Ser  
770 775 780  
Trp Val Val Tyr Gly Val Thr Ser Trp Gly Tyr Gly Cys Gly Val Lys  
785 790 795 800  
Asp Ser Pro Gly Val Tyr Thr Lys Val Ser Ala Phe Val Pro Trp Ile  
805 810 815

WO 99/05290

PCT/JP98/03324

Lys Ser Val Thr Lys Leu

820

2 2 / 2 2

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP98/03324

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl<sup>6</sup> C12N15/57, C07K14/47, 16/40, C12N5/06, 9/64, C12P21/02

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl<sup>6</sup> C12N15/57, C07K14/47, 16/40, C12N5/06, 9/64, C12P21/02

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)  
CA (STN), REGISTRY (STN), Swiss-Prot/PIR/GENESEQ

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X, P	KARL PROBA, THOMAS P. GSCHWEND, PETER SONDEREGGER, "Cloning and sequencing of the cDNA encoding human neurotrypsin", <i>Biochimica et Biophysica Acta</i> , 1998, Vol. 1396, No. 2, p.143-147	1-11
A, P	YOSHIRO YAMAMURA, KYOKO YAMASHIRO, NOBUO TSURUOKA, HIROSHI NAKAZATO, ATSUSHI TSUJIMURA, NOZOMI YAMAGUCHI, "Molecular Cloning of a Novel Brain-Specific Serine Protease with a Kringle-like Structure and Three Scavenger Receptor Cysteine-Rich Motifs", <i>Biochemical and Biophysical Research Communications</i> , 1997, Vol. 239, No. 2, p.386-392	1-11

 Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&" document member of the same patent family
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search  
31 August, 1998 (31. 08. 98)Date of mailing of the international search report  
8 September, 1998 (08. 09. 98)Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

## A. 発明の属する分野の分類(国際特許分類(IPC))

Int. C1° C12N15/57, C07K14/47, 16/40, C12N5/06, 9/64, C12P21/02

## B. 調査を行った分野

## 調査を行った最小限資料(国際特許分類(IPC))

Int. C1° C12N15/57, C07K14/47, 16/40, C12N5/06, 9/64, C12P21/02

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

## 国際調査で使用した電子データベース(データベースの名称、調査に使用した用語)

CA (STN)

REGISTRY (STN)

Swiss-Prot/PIR/GENESEQ

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X, P	KARL PROBA, THOMAS P. GSCHWEND, PETER SONDEREGGER, "Cloning and sequencing of the cDNA encoding human neurotrypsin", Biochimica et Biophysica Acta, 1998, Vol. 1396, No. 2, p. 143-147	1-11
A, P	YOSHIRO YAMAMURA, KYOKO YAMASHIRO, NOBUO TSURUOKA, HIROSHI NAKAZATO, ATSUSHI TSUJIMURA, NOZOMI YAMAGUCHI, "Molecular Cloning of a Novel Brain-Specific Serine Protease with a Kringle-like Structure and Three Scavenger Receptor Cysteine-Rich Motifs", Biochemical and Biophysical Research Communications, 1997, Vol. 239, No. 2, p. 386-392	1-11

 C欄の続きにも文献が列挙されている。 パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献(理由を付す)

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

## の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&amp;」同一パテントファミリー文献

## 国際調査を完了した日

31.08.98

## 国際調査報告の発送日

08.09.98

## 国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

## 特許庁審査官(権限のある職員)

吉住 和之

印

4B

9165

電話番号 03-3581-1101 内線 3449

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

NOTICE INFORMING THE APPLICANT OF THE  
COMMUNICATION OF THE INTERNATIONAL  
APPLICATION TO THE DESIGNATED OFFICES

(PCT Rule 47.1(c), first sentence)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

ISHIDA, Takashi  
A. Aoki & Associates  
Toranomon 37 Mori Building  
5-1, Toranomon 3-chome  
Minato-ku  
Tokyo 105-8423  
JAPON

2



Date of mailing (day/month/year) 04 February 1999 (04.02.99)		
Applicant's or agent's file reference F867-PCT		
International application No. PCT/JP98/03324	International filing date (day/month/year) 24 July 1998 (24.07.98)	Priority date (day/month/year) 24 July 1997 (24.07.97)
Applicant SUNTORY LIMITED et al		

1. Notice is hereby given that the International Bureau has communicated, as provided in Article 20, the international application to the following designated Offices on the date indicated above as the date of mailing of this Notice:  
EP,US

In accordance with Rule 47.1(c), third sentence, those Offices will accept the present Notice as conclusive evidence that the communication of the international application has duly taken place on the date of mailing indicated above and no copy of the international application is required to be furnished by the applicant to the designated Office(s).

2. The following designated Offices have waived the requirement for such a communication at this time:  
None

The communication will be made to those Offices only upon their request. Furthermore, those Offices do not require the applicant to furnish a copy of the international application (Rule 49.1(a-bis)).

3. Enclosed with this Notice is a copy of the international application as published by the International Bureau on 04 February 1999 (04.02.99) under No. WO 99/05290

**REMINDER REGARDING CHAPTER II (Article 31(2)(a) and Rule 54.2)**

If the applicant wishes to postpone entry into the national phase until 30 months (or later in some Offices) from the priority date, a demand for international preliminary examination must be filed with the competent International Preliminary Examining Authority before the expiration of 19 months from the priority date.

It is the applicant's sole responsibility to monitor the 19-month time limit.

Note that only an applicant who is a national or resident of a PCT Contracting State which is bound by Chapter II has the right to file a demand for international preliminary examination.

**REMINDER REGARDING ENTRY INTO THE NATIONAL PHASE (Article 22 or 39(1))**

If the applicant wishes to proceed with the international application in the national phase, he must, within 20 months or 30 months, or later in some Offices, perform the acts referred to therein before each designated or elected Office.

For further important information on the time limits and acts to be performed for entering the national phase, see the Annex to Form PCT/IB/301 (Notification of Receipt of Record Copy) and Volume II of the PCT Applicant's Guide.

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland Facsimile No. (41-22) 740.14.35	Authorized officer J. Zahra Telephone No. (41-22) 338.83.38
--	---

## 特許協力条約に基づく国際出願

## 願書

出願人は、この国際出願が特許協力条約に基づいて処理されることを請求する。

国際出願番号

PCT

24.7.98

(交付印)

受領印

出願人又は代理人の著者記号  
(必要する場合、最大13字)

F 867-PCT

## 第Ⅱ 特許 明細の名称

新規セリンプロテアーゼ

## 第Ⅲ 特許 出願人

氏名(名称)及びあて名: (姓・名の順に記載; 他人は公式の完全な名前を記載; あて名は郵便番号及び国名も記載)

サントリー株式会社

SUNTORY LIMITED

〒530-8203 日本国大阪府大阪市北区堂島浜2丁目1番40号

1-40, Dojimahama 2-chome, Kita-ku, Osaka-shi, OSAKA 530-8203 JAPAN

この欄に記載した者は、  
発明者でもある。

電話番号:

ファクシミリ番号:

加入電話番号:

国籍(国名): 日本国 JAPAN

住所(国名): 日本国 JAPAN

この欄に記載した者は、次の  
指定国についての出願人である:  
すべての指定国    米国を除くすべての指定国    米国のみ    追記欄に記載した指定国

## 第Ⅳ 特許 その他の出願人又は著者明細

氏名(名称)及びあて名: (姓・名の順に記載; 他人は公式の完全な名前を記載; あて名は郵便番号及び国名も記載)

鶴岡伸夫 TSURUOKA Nobuo

〒567-0827 日本国大阪府茨木市稻葉町18-7-501

18-7-501, Inaba-cho, Ibaraki-shi, OSAKA 567-0827 JAPAN

この欄に記載した者は  
次に該当する:

出願人のみである。出願人及び発明者である。

発明者のみである。  
(ここにレ印を付したときは、  
下に記入しないこと)

国籍(国名): 日本国 JAPAN

住所(国名): 日本国 JAPAN

この欄に記載した者は、次の  
指定国についての出願人である:  
すべての指定国    米国を除くすべての指定国    米国のみ    追記欄に記載した指定国

その他の出願人又は発明者が該欄に記載されている。

## 第Ⅴ 特許 代理人又は共通の代理人、通知のあて名

次に記載された者は、国際機関において出願人のために行動する:  
代理人    共通の代表者

氏名(名称)及びあて名: (姓・名の順に記載; 他人は公式の完全な名前を記載; あて名は郵便番号及び国名も記載)

弁理士(7751)石田敬 ISHIDA Takashi

〒105-8428 日本国東京都港区虎ノ門三丁目5番1号

虎ノ門37森ビル 青和特許法律事務所

AOKI &amp; ASSOCIATES

Toranomon 37 Mori Bldg., 5-1, Toranomon 3-chome, Minato-ku,  
TOKYO 105-8423 JAPAN

電話番号:

03-5470-1900

ファクシミリ番号:

03-5470-1911

加入電話番号:

J 26282

通知のあて名: 代理人又は共通の代表者が通知されておらず、上記欄内に特に通知が記載されるあて名を記載している場合は、レ印を付す

## 第3回特許の発明者 その他の出版人又は著者を明記

この欄を記入しないときは、この用紙を廃棄にさめないこと。

氏名（名前）及びあて名：（姓・名の前に記載；法人は公式の完全な名称を記載；あて名は郵便番号及び国名も記載）

山城 恒子 YAMASHIRO Kyoko

〒569-0852 日本国大阪府高槻市北柳川町15-13-211

15-13-211, Kitayananagawa-cho, Takatsuki-shi, OSAKA 569-0852 JAPAN

この欄に記載した者は、  
次に該当する：

出版人のみである。

出版人及び発明者である。

発明者のみである。  
(ここに印を付したときは、以下に記入しないこと)

国籍（国名）： 日本国 JAPAN

住所（国名）： 日本国 JAPAN

この欄に記載した者は、次の  
指定国についての出願人である：  
 **すべての指定国**  **米国を除くすべての指定国**  **米国のみ**  **追記欄に記載した指定国**

氏名（名前）及びあて名：（姓・名の前に記載；法人は公式の完全な名称を記載；あて名は郵便番号及び国名も記載）

山口 希 YAMAGUCHI Nozomi

〒603-8146 日本国京都府京都市北区鞍馬口通り寺町西入ル新御盛口町  
285-79285-79, Shingoryoguchi-cho, Teramachinishi-iru, Kuramaguchi-tori,  
Kita-ku, Kyoto-shi, KYOTO 603-8146 JAPANこの欄に記載した者は、  
次に該当する：

出版人のみである。

出版人及び発明者である。

発明者のみである。  
(ここに印を付したときは、以下に記入しないこと)

国籍（国名）： 日本国 JAPAN

住所（国名）： 日本国 JAPAN

この欄に記載した者は、次の  
指定国についての出願人である：  
 **すべての指定国**  **米国を除くすべての指定国**  **米国のみ**  **追記欄に記載した指定国**

氏名（名前）及びあて名：（姓・名の前に記載；法人は公式の完全な名称を記載；あて名は郵便番号及び国名も記載）

この欄に記載した者は、  
次に該当する：

出版人のみである。

出版人及び発明者である。

発明者のみである。  
(ここに印を付したときは、以下に記入しないこと)

国籍（国名）：

住所（国名）：

この欄に記載した者は、次の  
指定国についての出願人である：  
 **すべての指定国**  **米国を除くすべての指定国**  **米国のみ**  **追記欄に記載した指定国**

氏名（名前）及びあて名：（姓・名の前に記載；法人は公式の完全な名称を記載；あて名は郵便番号及び国名も記載）

この欄に記載した者は、  
次に該当する：

出版人のみである。

出版人及び発明者である。

発明者のみである。  
(ここに印を付したときは、以下に記入しないこと)

国籍（国名）：

住所（国名）：

この欄に記載した者は、次の  
指定国についての出願人である：  
 **すべての指定国**  **米国を除くすべての指定国**  **米国のみ**  **追記欄に記載した指定国** その他の出版人又は発明者が他の欄に記載されている。

第Ⅴ回 国の選定

規則 4.9(c)の規定に基づき次の指定を行う(複数の口に複数選択すること: 少なくとも1つの口に複数選択すること)。

II. 国の選定

A P A R I P O 特許出願: C H ガーナ Ghana, C M ガンビア Gambia, K C ケニア Kenya, L S レソト Lesotho, M W マラウイ Malawi, S D スーダン Sudan, S Z スワジ蘭 Swaziland, U G ウガンダ Uganda, Z W ジンバブエ Zimbabwe, 及びハラレプロトコルと特許協力条約の締約国である他の国

E A ニーラシア 特許出願: A M アルメニア Armenia, A Z アゼルバイジャン Azerbaijan, B Y ベラルーシ Belarus, K G キルギス Kyrgyzstan, K Z カザフスタン Kazakhstan, M D モルドバ Republic of Moldova, R U ロシア Russian Federation, T J タジキスタン Tajikistan, T M トルクメニスタン Turkmenistan, 及びユーラシア 異民族と特許協力条約の締約国である他の国

E P ヨーロッパ特許出願: A T オーストリア Austria, B E ベルギー Belgium, C H and L I スイス及びリヒテンシュタイン Switzerland and Liechtenstein, C Y キプロス Cyprus, D E ドイツ Germany, D K デンマーク Denmark, E S スペイン Spain, F I フィンランド Finland, F R フランス France, G B 英国 United Kingdom, G R ギリシャ Greece, I E アイルランド Ireland, I T イタリア Italy, L U ルクセンブルク Luxembourg, M C モナコ Monaco, N L オランダ Netherlands, P T ポルトガル Portugal, S E スウェーデン Sweden, 及びヨーロッパ特許出願と特許協力条約の締約国である他の国

O A O A P I 特許出願: B F ブルキナ・ファソ Burkina Faso, B J ベナン Benin, C I 中央アフリカ Central African Republic, C O コンゴ Congo, C I コートジボアール Côte d'Ivoire, C M カメルーン Cameroon, C A ガボン Gabon, G N ギニア Guinea, M L マリ Mali, M R モーリタニア Mauritania, N E ニジェール Niger, S E セネガル Senegal, T D チャド Chad, T G トーゴ Togo, 及びアフリカの所有権機関のメンバー国と特許協力条約の締約国である他の国(他の履歴の記述又は枚数を求める場合は点線上に記入する)

III. 国の選定(他の候補の保護又は堅似を求める場合には点線上に記入する)

A L アルバニア Albania  
 A M アルメニア Armenia  
 A T オーストリア Austria  
 A U オーストラリア Australia  
 A Z アゼルバイジャン Azerbaijan  
 B A ボスニア・ヘルツェゴビナ Bosnia and Herzegovina  
  
 B B バルバドス Barbados  
 B G ブルガリア Bulgaria  
 B R ブラジル Brazil  
 B Y ベラルーシ Belarus  
 C A カナダ Canada  
 C H and L I スイス及びリヒテンシュタイン Switzerland and Liechtenstein  
  
 C N 中国 China  
 C U キューバ Cuba  
 C Z チェコ Czech Republic  
 D E ドイツ Germany  
 D K デンマーク Denmark  
 E E エストニア Estonia  
 E S スペイン Spain  
 F I フィンランド Finland  
 G B 英国 United Kingdom  
 G E ジルジア Georgia  
 G H ガーナ Ghana  
 G M ガンビア Gambia  
 G W ギニア・ビサオ Guinea-Bissau  
 H R クロアチア Croatia  
 H U ハンガリー Hungary  
 I D インドネシア Indonesia  
 I L イスラエル Israel  
 I S アイスランド Iceland  
 J P 日本 Japan  
 K E ケニア Kenya  
 K G キルギス Kyrgyzstan  
 K R 韓国 Republic of Korea  
 K Z カザフスタン Kazakhstan  
 L C セント・ルシア Saint Lucia  
 L K スリ・ランカ Sri Lanka  
 L R リベリア Liberia  
 L S レソト Lesotho  
  
 L T リトアニア Lithuania  
 L U ルクセンブルク Luxembourg  
 L V ラトヴィア Latvia  
 M D モルドバ Republic of Moldova  
 M G マダガスカル Madagascar  
 M K マケドニア旧ユーゴスラヴィア共和国 The former Yugoslav Republic of Macedonia  
  
 M N モンゴル Mongolia  
 M W マラウイ Malawi  
 M X メキシコ Mexico  
 N O ノルウェー Norway  
 N Z ニュージーランド New Zealand  
 P L ポーランド Poland  
 P T ポルトガル Portugal  
 R O ルーマニア Romania  
 R U ロシア Russian Federation  
 S D スーダン Sudan  
 S E スウェーデン Sweden  
 S G シンガポール Singapore  
 S I スロヴェニア Slovenia  
 S K スロバキア Slovakia  
 S L シエラ・レオネ Sierra Leone  
 T J タジキスタン Tajikistan  
 T R トルクメニスタン Turkmenistan  
 T R トルコ Turkey  
 T T トリニティ・トバゴ Trinidad and Tobago  
 U A ウクライナ Ukraine  
 U G ウガンダ Uganda  
 U S 米国 United States of America  
  
 U Z ウズベキスタン Uzbekistan  
 V N ベトナム Viet Nam  
 Y U ユーゴスラヴィア Yugoslavia  
 Z W ジンバブエ Zimbabwe

以下の口は、この様式の施行後に特許協力条約の締約国となった国を指定(国内特許のために)するためのものである

.....  
 .....  
 .....  
 .....  
 .....

候補の選定の宣言: 出願人は、上記の指定に加えて、規則 4.9(b)の規定に基づき、特許協力条約の下で認められる他の全ての国の候補を行う。ただし、この宣言から称く旨の表示を追加欄にした者は、指定から除外される。出願人は、これらの追加される指定が候補を除外としていること、並びに优先日から 15 月が経過する前にその候補がなされない指定は、この期間の候補時に、出願人によって取り下げられたものとみなされることを宣言する。(候補の候補は、候補を特定する選択の提出と候補手数料及び候補手数料のMRAからなる。この候補は、优先日から 15 月以内に登録官庁へ提出しなければならない。)

## 1. 会での情報を該当する欄の中に記載できないとき。

この場合は、「第Ⅳ欄…の続き」(横書きを表示する)と表示し、記載できない欄の指示と同じ方法で記入する。すなはち、(1)出願人は発明者として2人以上いる場合で、「複数」を表示できないとき。

この場合は、「第Ⅳ欄の続き」と表示し、第Ⅳ欄で求められている同じ情報と、それぞれの名について記述する。(2)第Ⅳ欄又は第Ⅴ欄の件の中で、「追記欄に記載した指定国」に印を付しているとき。

この場合は、「第Ⅳ欄の続き」、「第Ⅳ欄の続き」又は「第Ⅳ欄及び第Ⅴ欄の続き」と記述し、該当する出願人の氏名(姓名)を表示し、それぞれの氏名(姓名)の次にその者が出願人となる指定国(広域特許の場合は、ARIPO特許・ユーラシア特許・ヨーロッパ特許・OAPI特許)を記載する。

(3)第Ⅳ欄又は第Ⅴ欄の件の中で、発明者又は実用新案及び出願人である者が、すべての指定国のための又は某国のために発明者ではないとき。

この場合は、「第Ⅳ欄の続き」、「第Ⅳ欄の続き」又は「第Ⅳ欄及び第Ⅴ欄の続き」と記述し、該当する発明者の氏名を表示し、その者が発明者である指定国(広域特許の場合は、ARIPO特許・ユーラシア特許・ヨーロッパ特許・OAPI特許)を記述する。

(4)第Ⅳ欄に示す代理人以外に代理人がいるとき。

この場合は、「第Ⅳ欄の続き」と表示し、第Ⅳ欄で求められている同じ情報と、それぞれの代理人について記述する。

(5)第Ⅳ欄において指定国又はOAPI特許が、「追加特許」又は「追加記」を伴うとき、又は、米国が「複数」又は「一部複数」を伴うとき。

この場合は、「第Ⅳ欄の続き」及び該当するそれぞれの指定国又はOAPI特許を表示し、それぞれの指定国又はOAPI特許の後、該特許又は原出願の番号及び特許付与日又は原出願日を記載する。

(6)第Ⅳ欄において優先権を主張する先の出願が4件以上あるとき。

この場合は、「第Ⅳ欄の続き」と表示し、第Ⅳ欄で求められている同じ情報と、それぞれの先の出願について記述する。

(7)第Ⅳ欄において先の出願がARIPOの特許出願であるとき。

この場合は、「第Ⅳ欄の続き」と表示し、その先の出願に対応する項目の番号を特定して、又は、その先の出願を行った工業所有権の保護のためのパリ条約同盟国の中から1ヶ国を表示する。

2. 出願人が、第Ⅳ欄における該当の宣言に因し、その宣言からいずれかの国を除くことを希望するとき。

この場合は、「該該の指定の宣言から、以下の指定国を除く」と記述し、除かれる国名又は2文字の国コードを表示する。

3. 出願人が、指定官庁について不別にならない団体又は新規性の喪失についての例外に因する国内性の適用を請求するとき。

この場合は、「不別にならない団体又は新規性喪失の例外に因する該述」と表示し、以下にその内容を記述する。

## IV欄の続き

氏名	弁理士(8787)福本 積	FUKUMOTO Tsumoru
氏名	弁理士(8826)戸田 利雄	TODA Toshio
氏名	弁理士(8289)西山 雅也	NISHIYAMA Masaya
氏名	弁理士(8133)樋口 外治	HIGUCHI Sotoji
あて名	IV欄に記載のあて名に同じ	The same address as Box IV

第Ⅵ回 国際特許出願手続		□ 前の優先権の主張（先の出願）が当該権に記載されている		
先の出願日 (日、月、年)	先の出願号	先の出願		
		国内出願：国名	広域出願：*広域官庁名	国際出願：受理官庁名
(1) 24. 07. 97	特願平9-213969号	日本国 JAPAN		
(2)				
(3)				

上記(1)の番号の先の出願（ただし、米国出願が提出される当該官庁に対して提出されたものに限る）のうち、次の(1)の番号のものについては、出願書類の送信原本を作成し、国際局へ送付することを、受理官庁（日本国特許庁の長官）に対して請求している。

\*先の出願が、A.R.I.P.O.の特許出願である場合には、その先の出願を行った工具所有権の保護のためのパリ条約同盟国の中なくとも1ヶ国を基準に表示しなければならない（規則4、10(6)(II)）。送信請求を要す。

第Ⅶ回 国際特許出願手続	
国際特許出願手続局（I.S.A.）の送信元	先の出願が本出願の手引用言文で：当該出願の提出（先の出願が、国際条約国によって既に実施又は請求されている場合）
I.S.A./ J.P.	出願日（日、月、年） 出願番号 国名（又は広域官庁）

第Ⅷ回 国際特許出願手続：出願の書類			
この国際出願の用紙の枚数は次のとおりである。			
類表	5枚	この国際出願には、以下にチェックした書類が添付されている。	
明細書（配列表を除く）	28枚	1. <input checked="" type="checkbox"/> 平置料計算用紙	5. <input type="checkbox"/> 優先権主張（上記第VI回の(1)の番号を記入する）
請求の範囲	2枚	2. <input checked="" type="checkbox"/> 添付する手続特許に相應する特許印紙を貼付した書類	6. <input type="checkbox"/> 国際出願の翻訳文（翻訳に使用した言語名を記載する）
要約書	1枚	3. <input type="checkbox"/> 国際事務局のロゴシールへの捺込みを証明する書面	7. <input type="checkbox"/> 寄託した微生物又は他の生物材料に関する書面
図面	13枚	4. <input type="checkbox"/> 別個の記名押印された委任状	8. <input checked="" type="checkbox"/> スクレオチド又はアミノ酸配列表（フレキシブルダイスク）
明細書の配列表	22枚	5. <input type="checkbox"/> 包括委任状の写し	9. <input checked="" type="checkbox"/> その他（書類名を詳細に記載する）
合計	71枚	6. <input type="checkbox"/> 記名押印（姓名）の説明書	7. <input type="checkbox"/> 陳述書 8. <input type="checkbox"/> フレキシブルディスク記録形式等の書類を記載した裏面

契約書とともに表示する箇面：	本国語出願の使用言語名：日本語
----------------	-----------------

第Ⅸ回 国際特許出願手続：出願の記名押印					
各人の氏名（姓氏）を記入し、その次に押印する。					
石田 敬		戸田利雄		樋口外治	
福本 積		西山雅也			

1. 国際出願として提出された書類の実際の受信の日		受理官庁記入欄	
3. 国際出願として提出された書類を補完する書類又は図面であって、その後期間内に提出されたものの実際の受理の日（訂正日）		2. 国際出願として提出された書類の実際の受理の日	
4. 特許協力条約第11条(2)に基づく必要な補完の期間内の受理の日		<input type="checkbox"/> 受理された	
5. 出願人により特定された 国際特許出願 I.S.A./ J.P.		<input type="checkbox"/> 不足箇所がある	
6. 調査手続料未払いにつき、国際調査機関に 調査用紙を送付していない			

記載原本の受取の日	
形式PCT/RO/101 (反映用紙) (1998年7月)	

E P U S

## 特許協力条約

PCT

## 国際調査報告

(法8条、法施行規則第40、41条)  
〔PCT18条、PCT規則43、44〕

出願人又は代理人 の書類記号 F867-PCT	今後の手続きについては、国際調査報告の送付通知様式(PCT/ISA/220) 及び下記5を参照すること。	
国際出願番号 PCT/JP98/03324	国際出願日 (日.月.年) 24.07.98	優先日 (日.月.年) 24.07.97
出願人(氏名又は名称) サントリー株式会社		

国際調査機関が作成したこの国際調査報告を法施行規則第41条(PCT18条)の規定に従い出願人に送付する。  
この写しは国際事務局にも送付される。

この国際調査報告は、全部で 2 ページである。 この調査報告に引用された先行技術文献の写しも添付されている。

1.  請求の範囲の一部の調査ができない(第I欄参照)。
2.  発明の単一性が欠如している(第II欄参照)。
3.  この国際出願は、ヌクレオチド及び/又はアミノ酸配列リストを含んでおり、次の配列リストに基づき国際調査を行った。
  - この国際出願と共に提出されたもの
  - 出願人がこの国際出願とは別に提出したもの
    - しかし、出願時の国際出願の開示の範囲を越える事項を含まない旨を記載した書面が添付されていない
    - この国際調査機関が書換えたもの
4. 発明の名称は  出願人が提出したものと承認する。  
 次に示すように国際調査機関が作成した。
 

---
5. 要約は  出願人が提出したものと承認する。  
 第III欄に示されているように、法施行規則第47条(PCT規則38.2(b))の規定により  
国際調査機関が作成した。出願人は、この国際調査報告の発送の日から1ヶ月以内にこ  
の国際調査機関に意見を提出することができる。
6. 要約書とともに公表される図は、  
第        図とする。  出願人が示したとおりである.  なし  
 出願人は図を示さなかった。  
 本図は発明の特徴を一層よく表している。

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. C1° C12N15/57, C07K14/47, 16/40, C12N5/06, 9/64, C12P21/02

## B. 調査を行った分野

## 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. C1° C12N15/57, C07K14/47, 16/40, C12N5/06, 9/64, C12P21/02

## 最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

## 国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CA (STN)

REGISTRY (STN)

Swiss-Prot/PIR/GENESEQ

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X, P	KARL PROBA, THOMAS P. GSCHWEND, PETER SONDEREGGER, "Cloning and sequencing of the cDNA encoding human neurotrypsin", Biochimica et Biophysica Acta, 1998, Vol. 1396, No. 2, p. 143-147	1-11
A, P	YOSHIRO YAMAMURA, KYOKO YAMASHIRO, NOBUO TSURUOKA, HIROSHI NAKAZATO, ATSUSHI TSUJIMURA, NOZOMI YAMAGUCHI, "Molecular Cloning of a Novel Brain-Specific Serine Protease with a Kringle-like Structure and Three Scavenger Receptor Cysteine-Rich Motifs", Biochemical and Biophysical Research Communications, 1997, Vol. 239, No. 2, p. 386-392	1-11

 C欄の続きにも文献が列挙されている。 パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

## の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&amp;」同一パテントファミリー文献

## 国際調査を完了した日

31.08.98

## 国際調査報告の発送日

08.09.98

## 国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

## 特許庁審査官 (権限のある職員)

吉住 和之

4B 9165

電話番号 03-3581-1101 内線 3449